

Université Bordeaux - Victor Segalen

Année 2011

Thèse n°1847

THÈSE

pour le

DOCTORAT DES UNIVERSITÉS BORDEAUX

Mention : Sciences, Technologies, Santé
Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 12 décembre 2011

Par ***Marie-Cécile DUFOUR***

Né(e) le 26 novembre 1966 à BORDEAUX

**Etude de l'efficacité des défenses de différents génotypes de *Vitis*
induites par élicitation face à la diversité génétique de bioagresseurs
(*Plasmopara viticola* et *Erysiphe necator*) :
du gène au champ.**

Membres du Jury :

M S. DELROT, Prof. à l'Université Bordeaux.....Président
M D. MERDINOGLU, Directeur de Recherche INRA Colmar.....Rapporteur
M B. DUMAS, Directeur de Recherche CNRS Toulouse.....Rapporteur
M P. REIGNAULT, Prof. à l'Université du littoral Côte d'Opale.....Examinateur
M O. LEGALL, Directeur de Recherche INRA, Chef Département SPE.....Examinateur
Mme M-F. CORIO-COSTET, Directeur de Recherche INRA Bordeaux.....Directeur de Thèse

RESUME

La vigne est soumise à la pression de nombreux bioagresseurs dont des parasites obligatoires tels que l'oïdium (*Erysiphe necator*) et le mildiou (*Plasmopara viticola*). La lutte contre les maladies causées par les pathogènes biotrophes nécessite une utilisation souvent intensive de fongicides. Le vignoble consomme à lui seul 16% des fongicides commercialisés chaque année en France. Pour réduire leur impact environnemental qui conduit à l'acquisition de la résistance aux pesticides des pathogène et la présence de résidus dans les vins et dans l'atmosphère, des efforts doivent être entrepris pour développer des stratégies de protection innovante de remplacement ou complémentaire permettant de réduire les intrants pesticides.

Les stimulateurs des défenses des plantes (SDP) permettent de limiter le développement des bioagresseurs en conditions contrôlées. Toutefois, leurs efficacités *in natura* sont variables et souvent décevantes. Suite au grand nombre de produits potentiellement stimulateurs des défenses des plantes, et à l'intérêt que leur portent les viticulteurs, il est nécessaire de disposer de connaissances et d'outils qui permettent d'évaluer leurs efficacités et mieux connaître leurs potentiels de protection du vignoble.

Pour ce faire, une méthode d'évaluation de l'efficacité de produits potentialisateurs ou éliciteurs a été développée au niveau biologique, moléculaire (expression de gènes impliqués dans les défenses) et biochimique (analyses qualitatives et quantitatives des polyphénols), nommée "BioMolChem". Cette méthode a permis d'évaluer l'efficacité de deux phosphonates et d'un analogue de l'acide salicylique, sur différents génotypes et phénotypes de mildiou de la vigne (sensibles ou résistants aux fongicides - *Plasmopara viticola*) et d'oïdium (de groupe génétique A ou B - *Erysiphe necator*). Cette approche méthodologique "BioMolChem" a permis d'établir des corrélations entre l'expression de gènes de défense, la présence de certains stilbènes et une efficacité des défenses de *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon vis-à-vis de l'oïdium et du mildiou. Les modifications des patrons d'expression des 19 gènes suivis dans les feuilles de vigne et les profils HPLC de polyphénols révèlent des mécanismes de défense multigéniques et complexes. Ainsi, les réactions de défense de la plante sont-elles modulées, en fonction de l'éliciteur considéré, mais aussi en fonction de la diversité phénotypique et génétique des agents pathogènes contre lesquels elle se défend. Ces défenses se caractérisent par une surexpression d'un ensemble de gènes de défense et une accumulation de composés phénoliques spécifiques.

Les marqueurs (gènes et molécules) ainsi identifiés, la méthode "BioMolChem" a été appliquée *in natura* et a conforté, pour partie, les résultats obtenus au laboratoire. Dans des conditions de fortes pressions parasitaires, il est donc possible de protéger les feuilles et les grappes, à l'aide de SDP et des essais d'association ou d'alternance avec des fongicides conventionnels montrent l'intérêt potentiel de l'emploi des SDP au vignoble.

Chemin faisant, dans le cadre d'une viticulture innovante et durable, les SDP et la méthode "BioMolChem" ont été appliqués sur des génotypes hybrides (*Vitis vinifera* x *Muscadinia rotundifolia*). Nous révélons que selon le niveau de résistance intrinsèque des génotypes (plus ou moins résistants à l'oïdium et au mildiou), il est possible d'augmenter le niveau de la résistance exprimée par élicitation. Ainsi, les SDP pourraient-ils s'avérer des alliés d'intérêt pour l'utilisation de variétés partiellement résistantes et limiter potentiellement le contournement des QTL de résistance.

L'ensemble de ce travail, à but appliqué, a conduit à l'obtention de résultats qui nous permettent de mieux comprendre comment la vigne réagit aux SDP dans son environnement agronomique. Leur exploitation et leur finalisation devraient nous permettre d'exploiter et de mettre en place une utilisation des éliciteurs mieux adaptée, à des stratégies alternatives ou complémentaires de la gestion des bioagresseurs de la vigne.

MOTS CLES

Vitis vinifera, Oïdium (*Erysiphe necator*), Mildiou (*Plasmopara viticola*), résistance systémique acquise, élicitation, BTH, phosphonate, expression gènes, phytoalexines, stilbènes, fosétyl-Aluminium, benzothiadiazole, SDP, variétés résistantes.

TITLE

Study of the effectiveness of different genotypes of *Vitis vinifera* defenses induced by elicitation face to the genetic diversity of pathogens (*Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*): from gene to the field.

ABSTRACT

Powdery (*Erysiphe necator*) and downy mildew (*Plasmopara viticola*) are very important grapevine diseases (*Vitis vinifera*). These two biotrophic pathogens, which are native to the United States, infect green vine tissues and cause significant economic loss as well as environmental damage through the repetitive applications of fungicides. To reduce their environmental impact efforts should be made to develop strategies to protect innovative alternative or complementary to reduce pesticide inputs.

In this study, the efficacy and the role of Benzothiadiazole (BTH), a salicylic acid analogue, and two phosphonate derivatives strengthen plant defence mechanisms against various isolates of downy and powdery mildews (*Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*). These compounds showed differences in their efficacy depending on the variability of mildews and highly dependent on plant genetics, environmental conditions and selection pressure. The plant defense stimulation could be an alternative or additional method to traditional pest management in the grapevine.

Tools “BioMolChem” were developed to better assess the defence status of the plant defences *in vitro* and *in natura*. Transcript kinetics of selected defence-related genes and polyphenol contents profiles, during *Vitis vinifera*-biotrophic pathogen interaction, were characterized, and the impact of pathogen diversity was investigated in the absence or presence of elicitation. In vineyard, under strong pathogen pressures, it is thus possible to protect leaves and clusters, with SDP and assays of association or alternation with conventional fungicides show the potential interest of the use of these SDP in the vineyard.

The grapevine defense mechanisms are complex, depending on the elicitor, leading to the coordinated accumulation of pathogenesis-related proteins (PR), the production of phytoalexins, and the reinforcement of plant cell walls.

On the way, within the framework of an innovative and sustainable viticulture, the SDP was applied to hybrid genotypes (*V. vinifera* x *M. rotundifolia*). We reveal that according to the level of intrinsic resistance of the genotypes (more or less resistant to powdery and to downy mildew), it is possible to increase the level of the expressed resistance. The SDP could become allies of interest in the use of partially resistant grapevine varieties.

The present findings provide insights into the potential use of transcripts and stilbenes as markers of the defense status of grapevine leaves with or without elicitation or infection, which should allow us to exploit and develop a better use of elicitors in alternative or complementary strategies in grapevine pest management.

KEY WORDS

Vitis vinifera, powdery mildew (*Erysiphe necator*), downy mildew (*Plasmopara viticola*), systemic acquired resistance, elicitation, BTH, phosphonate, gene expression, phytoalexins, stilbenes.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABA : Acide Abscissique
ACC : Acide 1-aminocyclopropane-1 carboxylique
A.D. : Arogonate déhydratase
Ade : Adénine
ADN : Acide Desoxyribonucléique
AdoMet : S-adenosyl-L-Méthionine
AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
ANR : Anthocyanidine Réductase
ANTS : Anthranilate Synthase
A.O.C : Allène Oxyde Cyclase
A.O.S.: Allène Oxyde Synthase
ARN : Acide Ribonucléique
ARN m : ARN messager
ASM : Acibenzolar *S* methyl
BA2H : Acide Benzoïque-2-Hydroxylase
BBCH : Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie
BC1 : Back Cross 1
BDA : Black Dead Arm
BTH : Benzothiadiazole
CAGT : Coniferyl Alcohol Glycosyl Transferase
CALS : Callose Synthase
CHI : Chalcone Isomérase
CHORM : Chorismate Mutase
CHORS : Chorismate Synthase
CHS : Chalcone Synthase
CIVB : Comité Interprofessionnel des Vins de Bordeaux
CTAB : Bromure de Cétyle Triméthyle-ammonium
DAG : Diacyl Glycérol
DEPC : Diethylpyrocarbonate
DMI : Inhibiteur de la Déméthylase
EC : Emulsion Concentrée
EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EF1 γ : Chaîne γ du Facteur d'Élongation 1
EST: Expressed Sequence Tag
ET: Ethylène
ETI: Effector-Triggered Immunity
EW : Emulsion aqueuse
FOS : Fosétyl-Aluminium, aluminium tris (ethyl phosphonate)
GAV-SVQV : Equipe Génétique et Amélioration de la Vigne – UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin
GESVAB : Groupe d'Étude des Substances Végétales à Activité Biologique
GRP : Protéine Riche en Glycine
GST : Glutathion S Transférase
HCl: Chlorure d'Hydrogène (acide chlorhydrique)
H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène
HPI : Heures après infection
HPLC : Chromatographie Liquide Haute performance
HR : Réaction Hypersensible

HRGP : Glycoprotéine Riche en Hydroxyproline
IBS : Inhibiteurs de la Biosynthèse des Stéroïdes
ICS : Isochorismate Synthase
IFV : Institut Français de la Vigne et du Vin
INRA : Institut National de Recherche Agronomique
IPP : Isopentényl diphosphate
IUPAC : Nom International Union of Pure and Applied Chemistry
JA : Acide Jasmonique
K.M.B.: Acide 2-Ceto-4-méthyle-Thiobutyrique
LAR : Résistance Locale Acquise
LDOX : Leucoanthocyanidine Di-Oxygénase
LRR : Leucine-Rich Repeat
LOX : Lipoxygénase
MAMP : Microbe Associated Molecular Pattern
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
Met : Méthionine
M.T.A : 5'-méthylthioadénosine
M.T.R : 5'-méthylthioribose
M.T.R.-1-P : 5'-méthylthioribose-1-phosphate
NaCl : Chlorure de sodium
NBS : Nucleotide Binding Site
NO : Oxyde Nitrique
O₂⁻ : anion superoxyde
OH⁻ : radical hydroxyle
O.P.C.-8 :0 : acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentyl)-cyclopentane-1 octanoïde
O.P.D.A. : acide 13-(S) hydroperoxy-octadécatriénoïque
OPR 3 : O.P.D.A réductase
PA : Proanthocyanidine
PAL : Phénylalanine Ammonia-Lyase
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR : Polymerase Chain Reaction
PER : Peroxydase
PGIP : Inhibiteur de PolyGalacturonase
Phe : Phénylalanine
P.L. : Pyruvate lyase
PLC : Phospholipase C
PLD.: Phospholipase D
POD : Processus Opérationnel et de Décision
PR : Pathogenesis Related Proteine
PR1 : PR protéine de classe 1
PR2 : PR protéine de classe 2
PR3 : PR protéine de classe 3
PR6 : PR protéine de classe 6
PR8 : PR protéine de classe 8
PR10 : PR protéine de classe 10
PRP : Protéine Riche en Proline
PVPP : poly-vinyl poly-pyrrolidone
PTI : PAMP-Triggered Immunity
QiIs : Quinone inside Inhibitors
QoIs : Quinone outside Inhibitors

QTL : Quantitative Trait Loci
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
RFPL : Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS : Formes Réactives de l'Oxygène
Rpv : QTL de Résistance à *Plasmopara viticola*
RT-PCR : Reverse transcription- PCR
Run : gène de Résistance à *Uncinula necator*
SA : Acide Salicylique
SAM : Sélection Assistée par Marqueurs
SAR : Résistance Systémique Acquise
SAU : Surface Agricole Utile
SC : Suspension Concentrée
SCAR : Sequence-Characterized Amplified Region
SDQPV : Sous Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SRPV : Services Régionaux de la Protection des Végétaux
SSR : Simple Sequence Repeat
STS : Stilbène Synthase
TIR : Toll-Interleukine 1 Receptor
UMR-SAVE : Unité Mixte de Recherche- Santé et Agroécologie du Vignoble
WG : Granulés solubles dans l'eau

REMERCIEMENTS

Voici venu le moment de remercier l'ensemble des gens qui m'ont aidé un peu ou beaucoup, de loin ou de près, ponctuellement ou tout au long de la thèse.

Je tiens à remercier les rapporteurs et examinateurs de mon travail de thèse pour leur disponibilité et qui, par leurs critiques et appréciations, ne pourront qu'enrichir mon travail.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Marie-France Corio-Costet, qui a accepté de me soutenir dans mon souhait de formation qualifiante, face à une hiérarchie hostile. Je n'ai sûrement pas les mots suffisants ni le vocabulaire assez étoffé pour vous témoigner tous mes remerciements. L'ensemble de ce travail n'aurait jamais été possible sans votre soutien. Vous m'avez accordé votre confiance et vous avez cru en moi. Vous m'avez permis d'élargir mes compétences, d'acquérir des connaissances et d'envisager mes activités professionnelles sous un nouveau jour. Je ne vous remercierai jamais assez pour m'avoir accordé la chance de réaliser cette aventure que je rêvais de vivre. Mais il faut être un peu masochiste pour se lancer aussi tardivement dans cette aventure. Vous m'avez offert l'opportunité également d'assister à des congrès scientifiques et de me faire connaître. Vous avez réussi à me faire oublier mes petites bêtises et surtout mon ancienne équipe, qui étaient très chères à mon cœur (une petite pensée affectueuse pour Christophe et Sylvia).

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à ceux qui ont participé à mon comité de thèse, et ont montré un peu d'intérêt à mon activité scientifique.

Je tiens également à remercier Stéphanie Cluzet et Jean-Michel Mérillon pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire du GESVAB et surtout Carole Lambert pour avoir lancé tous mes échantillons en HPLC, sans laquelle mon travail aurait eu, sans aucun doute, moins de pertinence.

Au sein du laboratoire, je tiens à remercier Gilles Taris qui m'a aidé dans la réalisation technique des expérimentations de laboratoire ou les notations au vignoble.

Je voudrai remercier tout particulièrement Lionel Druelle (et toute son équipe), qui m'a tellement assistée dans les expérimentations au vignoble, il m'a tellement appris. Grâce à sa gentillesse, sa disponibilité, ces trois années d'expérimentations furent un grand plaisir et ma bouffée d'oxygène.

Une pensée pour les stagiaires qui ont participé à ce travail, Damien, Hélène et Tarek.

Je tiens à remercier l'INRA qui m'a donné cette opportunité et le CIVB qui a soutenu cette thématique et apporté son soutien financier.

Je ne peux pas terminer sans remercier tous mes amis et ma famille qui ont toujours été auprès de nous pour nous soutenir. Les Chaloux, les Bussière, les Guilhem, Flo et Steph, Papa, Maman, Bernard et Sandrine, Zouzou et Franck, je n'ai pas de mots assez forts pour vous dire merci. Merci Nathalie pour avoir pris le temps de corriger mon mémoire (même au fond de ton lit avec 40° de fièvre). Grâce à votre amour et amitié que vous nous avez témoignés, les épreuves que nous avons traversées font maintenant presque partie du passé.

J'envoie quelques mots à mon mari (car si les difficultés de la vie ne nous ont pas épargnés ces trois dernières années, nous avons réussi à franchir ensemble ces épreuves). Tu as fait preuve de beaucoup de patience et de persévérance. Tu m'as donné du courage et une force que je ne me connaissais pas pour surmonter bien des obstacles. J'essaye de te remercier tous les jours de ma vie en te donnant toutes les choses que j'ai à t'offrir. Je t'aime tellement fort.

Merci à mes trois enfants que certes j'ai délaissé ces derniers mois mais qui m'ont fortement soutenue à passer cette étape. Vous avez fait preuve de tolérance et de patience avec moi. Youpi, c'est enfin la fin de cette aventure !!!

Introduction générale	1
1. La vigne (<i>Vitis vinifera</i> L.)	3
1.1 Développement et physiologie de la vigne	3
1.1.1. Taxonomie et diversité	3
1.1.2. Développement et physiologie de la vigne	4
1.2. Importance de la vigne cultivée	5
1.3. Sensibilité de la vigne	7
2. Agents pathogènes biotrophes de la vigne	9
2.1. <i>Plasmopara viticola</i>	9
2.1.1 Biologie	9
2.2.2. Symptomatologie	11
2.2.3. Diversité	11
2.2 <i>Erysiphe necator</i>	13
2.2.1 Biologie	13
2.2.2. Symptomatologie	13
2.2.3. Diversité	16
3. Protection du vignoble	17
3.1. Lutte anti-mildiou	17
3.1.1. Lutte préventive	18
3.1.2. Mesures prophylactiques	18
3.1.3. Lutte chimique	18
3.1.4. Lutte raisonnée	20
3.2. Lutte anti-oïdium	21
3.2.1. Mesures prophylactiques	23
3.2.2. Lutte chimique	23
3.2.3. Lutte raisonnée	24
3.2.4. Lutte biologique	24
4 Interaction hôte-pathogène	25
4.1 Reconnaissance du pathogène	25
4.1.1. Eliciteurs généraux	25
4.1.2. Eliciteurs spécifiques : modèle gène pour gène	25
4.2 Voies de signalisation impliquées dans la mise en place des mécanismes de défense de la plante	27
4.2.1. Flux ionique	27
4.2.2. Les espèces réactives de l'oxygène	30
4.2.3. La voie de transduction des MAP kinase	30
4.2.4. Les molécules "Signal"	30
4.3 Réactions de défense	35
4.3.1. Le renforcement des parois végétales	35
4.3.2. La production de métabolites secondaires	35
4.3.3. La synthèse de protéines de défense	41
5. Amélioration de la protection de la vigne contre des pathogènes biotrophes	41
5.1 Amélioration variétale	41
5.2. Vignes transgéniques	46
5.3. Elicitation des défenses naturelles de la vigne	46
5.3.1. Elicitation d'origine biotique	47
5.3.2. Eliciteurs d'origine synthétique	49
6. Objectifs de ce travail de recherche	53
Matériel et Méthodes	57
1. Matériels biologiques	57
1.1 Matériel végétal	57
1.1.1 En condition contrôlées	57

1.1.2 Au vignoble	57
1.2 Matériel fongique	58
1.2.1 <i>Erysiphe necator</i>	58
1.2.2 <i>Plasmopara viticola</i>	59
1.3 Produits chimiques	60
1.3.1 Molécules potentiellement élicitrices	60
1.3.2 Molécules fongicides	60
1.3.3 Polyphénols de référence	63
2. Méthodes	64
2.1. Production de matériel fongique	64
2.1.1. <i>E. necator</i>	64
2.1.2. <i>P. viticola</i>	64
2.2. Evaluation et comparaison des efficacités d'élicitation des défenses de la vigne	64
2.2.1. Evaluation de la croissance des agents pathogènes	65
2.2.2. Analyses moléculaires	73
2.2.3. Analyses biochimiques	76
2.2.4. Qualité et rendement de la récolte	77
2.3. Traitements statistiques	77

Résultats 81

Partie I: Comparaison de la stimulation des défenses de la vigne par le BTH et deux molécules phosphonates *in vitro* sur le cultivar sensible Cabernet Sauvignon et l'impact de la diversité génétique des pathogènes sur l'efficacité de stimulation.

1 Introduction 83

2 Résultats 85

2.1 Article 1 87

Sensitivity of biotrophic pathogens of grapevine (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*) to acibenzolar-S-methyl and two phosphonates (soumis à Pest Management Science)

ABSTRACT
 1 INTRODUCTION
 2 MATERIALS AND METHODS
 3 RESULTS
 4 DISCUSSIONS
 ACKNOWLEDGEMENTS
 REFERENCES
 FIGURE LEGENDS

2.2 Article 2 113

Benzothiadiazole-primed defense responses and enhanced differential expression of defense genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*). (Sous presse à Plant Pathology).

ABSTRACT
 1 INTRODUCTION
 2 MATERIALS AND METHODS
 3 RESULTS
 4 DISCUSSIONS
 ACKNOWLEDGEMENTS
 REFERENCES
 FIGURE LEGENDS

2.3 Article 3 147

Fosetyl-Aluminium enhances disease resistance against powdery and downy mildew in grapevine (en preparation pour soumission dans Pest Management Science)

ABSTRACT	
1 INTRODUCTION	
2 MATERIALS AND METHODS	
3 RESULTS	
4 DISCUSSIONS	
ACKNOWLEDGEMENTS	
REFERENCES	
FIGURE LEGENDS	

2.4 Article 4 175

A fertilizer with potassium-phosphonate elicits disease resistance against powdery and downy mildew in grapevine (en preparation pour soumission dans Journal of Agricultural and Food Chemistry)

ABSTRACT 8	
INTRODUCTION	
MATERIALS AND METHODS	
RESULTS	
DISCUSSIONS	
ABBREVIATION USED	
ACKNOWLEDGEMENTS	
REFERENCES	
FIGURE LEGENDS	

3. Conclusions 204

Partie II: Essais terrains 2009-2010-2011

1 Introduction	211
2 Résultats	213
2.1 Efficacité des différents traitements sur le développement des épidémies de mildiou et d'oïdium de la vigne	213
2.1.1 Effets des traitements sur le mildiou de la vigne	213
2.1.2 Effets des traitements sur l'oïdium de la vigne	220
2.2 Efficacité des différents traitements sur le rendement et la qualité de la récolte	222
2.2.1. Rendement des essais	222
2.2.2. Qualité des récoltes	226
2.3 Analyses de l'expression des gènes <i>in natura</i> en 2009	229
2.4 Analyses qualitatives et quantitatives des stilbènes <i>in natura</i>	232
3 Conclusions et perspectives	234

Partie III : Impact de la diversité génétique de la vigne sur l'efficacité Evaluation de l'efficacité de stimulation des défenses de la vigne *in vitro* après élicitation avec le BTH sur les génotypes partiellement résistants de Colmar

1. Introduction	239
1.1 Evaluation au niveau biologique : tests d'efficacité	
1.2 Evaluation au niveau moléculaire : Expression génique	
1.3 Analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques par HPLC.	
2. Résultats	241
2.1. Caractéristiques des différents génotypes de <i>Vitis</i> utilisés	241
2.1.1. Comparaison et comportement des différents génotypes au niveau biologique	241
2.1.2. Comparaison des profils d'expression des gènes des différents génotypes	242
2.1.3. Comparaison des profils d'expression des différents génotypes après inoculation avec <i>P. viticola</i> et <i>E. necator</i>	246
2.1.4. Comparaison des profils en polyphénols des différents génotypes	248
2.1.5. Comparaison des profils en polyphénols des différents génotypes après inoculation de mildiou et d'oïdium	250
2.2. Caractéristiques des différents génotypes de <i>Vitis</i> utilisés après traitement avec le BTH	250

2.2.1. Comparaison et comportement des différents géotypes au niveau biologique après traitement avec le BTH	250
2.2.2. Comparaison des profils d'expression après traitement avec le BTH	251
2.2.3. Comparaison des profils d'expression après traitement avec le BTH en réponse à l'attaque de mildiou et d'oïdium	254
2.2.4. Comparaison des profils en polyphénols des différents géotypes après traitement avec le BTH	255
2.2.5. Comparaison des profils en polyphénols des différents géotypes après traitement avec le BTH en réponse à l'attaque de mildiou et d'oïdium	257
3. Conclusions, discussions et perspectives	257

Conclusions générales et perspectives **263**

Références bibliographiques **271**

Annexes **299**

1. Essai Mildiou 2009
2. Essai Mildiou 2010
3. Essai Oïdium 2010
4. Essai Mildiou 2011
5. Essai Oïdium 2011
6. Échelle BBCH des stades phénologiques de la vigne (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*)
7. Représentation des voies métaboliques suivies au niveau moléculaire et biochimique
8. Photographies de feuilles et grappes sur les différentes modalités de traitement de l'essai mildiou 2009 au 25 août
9. Photographies de feuilles et grappes sur les différentes modalités de traitement de l'essai mildiou 2009 au 14 septembre
10. Photographies de feuilles et grappes sur les différentes modalités de traitement de l'essai mildiou 2010 au 13 juillet
11. Photographies de feuilles et grappes sur les différentes modalités de traitement de l'essai mildiou 2010 au 14 septembre
12. Photographies de feuilles et grappes sur les différentes modalités de traitement de l'essai mildiou 2011 au 25 août
13. Photographies de feuilles et grappes sur les différentes modalités de traitement de l'essai oïdium 2010 au 13 juillet
14. Photographies de feuilles et grappes sur les différentes modalités de traitement de l'essai oïdium 2010 au 14 septembre
15. Photographies de feuilles et grappes sur les différentes modalités de traitement de l'essai oïdium 2011 au 25 août
16. Illustration de Vincent Jeannerot sur le cycle biologique de *P. viticola*
17. Illustration de Vincent Jeannerot sur le cycle biologique de *E. necator*
18. Dufour, M.-C. ; Fontaine, S. ; Montarry, J. ; Corio-Costet, M.-F. Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest management Science* (2011), 67: 60-69
19. Corio-Costet, M.-F. ; Dufour, M.-C.; Cigna, J.; Abadie, P.; Chen, W.-J. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* (2011), 129: 315-329

Publications et communication réalisées au cours de la these en lien avec la diversité génétique des agents pathogènes.

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

La vigne est soumise à la pression de nombreux bioagresseurs dont des parasites obligatoires tels que l'oïdium (*Erysiphe necator*) et le mildiou (*Plasmopara viticola*). À elle seule, avec moins de 3% de surface agricole utile (SAU), la vigne consomme 16 % des pesticides commercialisés en France chaque année, dont 80 % sont des fongicides (d'après l'expertise collective INRA-CEMAGREF, 2005). Actuellement, dans le contexte viticole français, la maîtrise des épidémies nécessite de nombreux traitements chimiques pouvant avoir des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé. L'utilisation de stimulateurs de défenses, aux côtés de la résistance variétale et de la lutte biologique, pourrait représenter une méthode de lutte alternative et/ou complémentaire d'intérêt.

Agissant généralement sur la plante et non directement sur le pathogène, les éliciteurs induisent une résistance de la plante hôte multifactorielle qui pourrait s'avérer plus difficile à contourner par le pathogène, que l'effet d'un fongicide uni-site (Santiago *et al.*, 2010). Les voies de signalisation intracellulaires activées chez les plantes suite à la réaction de défense convergent notamment vers la production de formes actives d'oxygène, d'hormones (acide salicylique (SA), acide jasmonique (JA), éthylène (ET) ou acide abscissique (ABA)). Elles conduisent aussi à l'induction de gènes de défense, la production de métabolites secondaires (phytoalexines, PR-protéines), à la mise en place d'un renforcement des parois cellulaires, et contribue à l'arrêt du développement du pathogène (Walters *et al.*, 2007, 2011). Malgré un effet des stimulateurs de défenses des plantes efficace et reproductible en conditions contrôlées au laboratoire, il s'avère, que leur application *in natura* soit plus délicate et présente généralement des efficacités très variables et décevantes. Confrontés à ce constat, acquérir des connaissances pour mieux comprendre les réactions de la vigne, la variabilité des réponses obtenues en fonction du fond génétique, des agents pathogènes et de l'environnement paraissait indispensable.

Des études préliminaires conduites au laboratoire ont permis de choisir des éliciteurs potentiellement intéressants, de composition chimique définie, qui présentent des efficacités stables et reproductibles contre les deux pathogènes majeurs de la vigne (l'oïdium et le mildiou) en conditions contrôlées. Notre intérêt s'est porté plus particulièrement sur les phosphonates et l'acibenzolar-S-méthyl (BTH), déjà bien connus comme stimulateurs des défenses des plantes (Iriti *et al.*, 2004 ; Daniel et Guest, 2006).

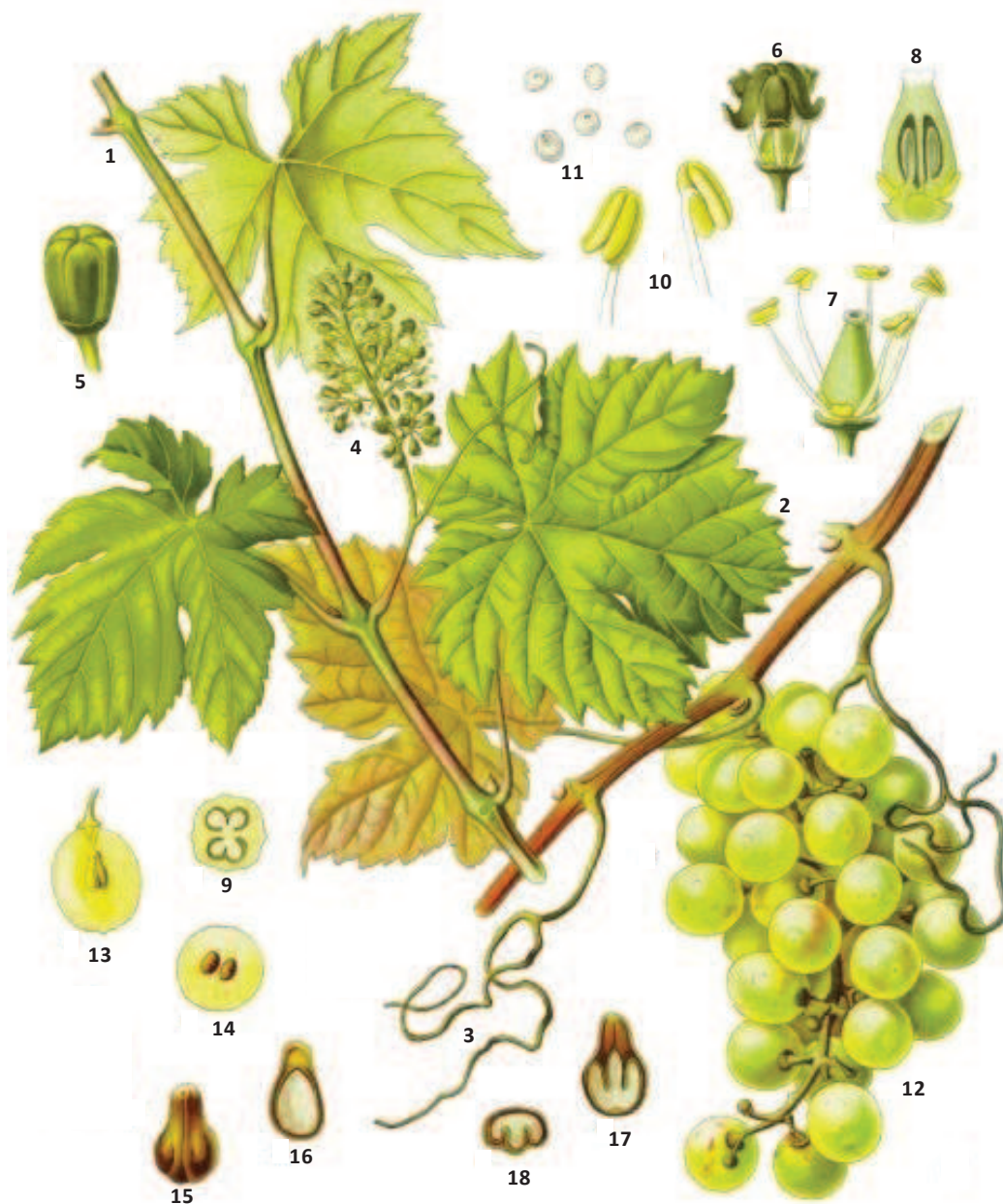
Ainsi, après une rapide mise au point bibliographique, nécessaire pour la compréhension du travail réalisé, la restitution de ce travail fait l'objet de trois parties.

1- La première partie porte sur l'efficacité de produits, sur différents agents pathogènes, en conditions contrôlées, et sur la description d'une méthode «BioMolChem» utilisée pour caractériser les réponses de la vigne.

2- La deuxième partie est consacrée à l'étude des SDP au vignoble, en présence de fortes pressions parasitaires d'oïdium et de mildiou. L'étude de l'efficacité des stimulations des défenses, l'analyse des profils de transcrits de gènes de défense, ainsi que l'analyse de polyphénols ont été réalisées, pour mieux appréhender la variabilité des réponses de *V. vinifera* à une élicitation.

3- La troisième partie s'est attachée à évaluer, l'intérêt de l'utilisation de SDP sur des géotypes hybrides partiellement résistants à l'oïdium et au mildiou de la vigne, dans le cadre du développement de nouvelles stratégies de lutte innovantes et durables.

L'ensemble de ce travail devant permettre une meilleure compréhension des défenses de la vigne après une élicitation dans diverses conditions environnementales.



Source: [<http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/allgemei/koehler/koeh-eng.htm>]

Figure 1 : *Vitis vinifera sativa*. (1) sarment ; (2) feuille à 5 nervures principales ; (3) vrille ; (4) Inflorescence ; (5) bouton floral (jeune fleur fermée) ; (6) ouverture de la corole de la fleur (fleur dehiscente) ; (7) fleur hermaphrodite possédant à la fois des étamines ($n=5$) et un pistil ; (8) coupe longitudinale de l'ovaire ; (9) coupe transversale de l'ovaire ; (10) étamine ; (11) grain de pollen ; (12) grappe de raisins ; (13) coupe longitudinale d'une baie ; (14) coupe transversale d'une baie ; (15) pépin de raisin (graine) ; (16 et 17) coupes longitudinales d'une graine et (18) coupe transversale d'un pépin.

1. La Vigne

La vigne est l'une des premières cultures domestiquée depuis l'antiquité (Figure 1), largement cultivée dans le monde. Ses fruits sont principalement transformés en vin ou spiritueux mais également destinés à la consommation de raisins de table, séchés ou encore traités en jus non alcoolisé.

1.1. Développement et physiologie de la vigne

1.1.1. Taxonomie et diversité

La vigne est une plante Angiosperme Dicotylédone appartenant à l'ordre des Rhamnales. Les Vitaceae comptent 14 genres (Tableau 1) dont les *Vitis* qui constituent le genre agronomiquement le plus important. Le genre *Vitis* se divise en deux sous-genres : *Muscadinia* et *Euvitis*. Le sous-genre *Muscadinia* ne comprend que trois espèces (*munsinia*, *popenoei* et *rotundifolia*). Le sous-genre *Euvitis* contient les vraies vignes ainsi que la quasi-totalité des vignes cultivées et comprend 74 espèces sauvages (Tableau 2) réparties entre les 35^{ème} et 50^{ème} parallèles, dans les zones tempérées et subtropicales de l'Europe et du Proche Orient, d'Asie Orientale et d'Amérique du Nord et Centrale. La principale espèce cultivée, au plan économique, est la vigne européenne, *Vitis vinifera* L., cultivée dans les régions tempérées au niveau mondial et présente sous la forme de plusieurs milliers de variétés (cultivars ou cépages).

Les vignes américaines sont résistantes à de nombreuses maladies, et sont utilisées comme porte-greffe dans 85% du vignoble mondial. L'introduction en Europe au cours du 19^{ème} siècle de *Vitis* américains a conduit à l'importation de maladies jusqu'alors inconnues (l'oïdium en 1845, le phylloxéra en 1868, le mildiou en 1878 et le black-rot en 1885).

Tableau 1: Division des Vitaceae comptant 14 genres (d'après Angiosperm Phylogeny Website, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>).

Genre	Nombre d'espèces
<i>Vitis</i>	108 (dont 28 fossiles, 15 douteuses)
<i>Cissus</i>	367 (dont 8 fossiles)
<i>Ampelopsis</i>	31 (dont 4 fossiles)
<i>Pterisanthes</i>	21
<i>Tetrastigma</i>	132 (dont 4 fossiles)
<i>Ampelocissus</i>	92
<i>Clematicissus</i>	1
<i>Parthenocissus-Landukia-Yua</i>	19-1-3
<i>Rhoicissus</i>	11
<i>Cayratia</i>	65 (dont 1 fossile)
<i>Acareosperma</i>	1
<i>Pterocissus</i>	1
<i>Cyphostemma</i>	258
<i>Nothocissus</i>	1

Tableau 2: Liste des 74 espèces de *Vitis* sauvages (d'après Zecca *et al.*, 2012)

Amérique du Nord	Asie
<i>Vitis acerifolia</i> Raf.	<i>Vitis amurensis</i> Rupr.
<i>Vitis aestivalis</i> Michx.	<i>Vitis barbata</i> Wall.
<i>Vitis arizonica</i> Engelm.	<i>Vitis bashanica</i> P.C.He
<i>Vitis × andersoni</i> Rehder (<i>Vitis coignetiae</i> × <i>Vitis riparia</i>)	<i>Vitis bellula</i> (Rehder) W.T.Wang
<i>Vitis berlandieri</i> Planch	<i>Vitis betulifolia</i> Diels & Gilg
<i>Vitis biformis</i> Rose	<i>Vitis bryoniifolia</i> Bunge
<i>Vitis bloodworthiana</i> Comeaux	<i>Vitis chunganensis</i> Hu
<i>Vitis × bourquina</i> Munson ex Viala	<i>Vitis chungii</i> F.P.Metcalf
<i>Vitis californica</i> Benth.	<i>Vitis davidii</i> (Rom.Caill.) Foëx
<i>Vitis × champinii</i> Planch.	<i>Vitis erythrophylla</i> W.T.Wang
<i>Vitis cinerea</i> (Engelm.) Engelm. ex Millardet	<i>Vitis fengqinensis</i> C.L.Li
<i>Vitis coignetiae</i> Pulliat ex Planch.	<i>Vitis ficifolia</i> Bunge
<i>Vitis × doaniana</i> Munson ex Viala	<i>Vitis hancockii</i> Hance
<i>Vitis girdiana</i> Munson	<i>Vitis hui</i> W.C.Cheng
<i>Vitis heyneana</i> Roem. & Schult.	<i>Vitis Jacquemontii</i> R.Parker
<i>Vitis jaegeriana</i> Comeaux	<i>Vitis jinggangensis</i> W.T.Wang
<i>Vitis labrusca</i> L.	<i>Vitis lanceolatifolia</i> C.L.Li
<i>Vitis monticola</i> Buckley	<i>Vitis longquanensis</i> P.L.Chiu
<i>Vitis mustangensis</i> Buckley	<i>Vitis menghaiensis</i> C.L.Li
<i>Vitis nesbittiana</i> Comeaux	<i>Vitis mengziensis</i> C.L.Li
<i>Vitis × novae-angliae</i> Fernald	<i>Vitis piasezkii</i> Maxim.
<i>Vitis palmata</i> Vahl	<i>Vitis pseudoreticulata</i> W.T.Wang
<i>Vitis riparia</i> Michx. - la vigne des rivages	<i>Vitis romanetii</i> Rom.Caill.
<i>Vitis rotundifolia</i> Michx.	<i>Vitis ruyuanensis</i> C.L.Li
<i>Vitis rupestris</i> Scheele - la vigne des rochers	<i>Vitis shenxiensis</i> C.L.Li
<i>Vitis shuttleworthii</i> House	<i>Vitis silvestrii</i> Pamp.
<i>Vitis sinocinerea</i> W.T.Wang	<i>Vitis tsoii</i> Merr.
<i>Vitis × slavini</i> Rehder (<i>Vitis argentifolia</i> × <i>Vitis riparia</i>)	<i>Vitis wenchouensis</i> C.Ling ex W.T.Wang
<i>Vitis tiliifolia</i> Humb. & Bonpl. ex Schult.	<i>Vitis wilsonae</i> hort. Veitch ex anon.
<i>Vitis treleasei</i> Munson ex L.H.Bailey	<i>Vitis wuhanensis</i> C.L.Li
<i>Vitis vulpina</i> L. ou <i>Vitis cordifolia</i> Michx.	<i>Vitis yunnanensis</i> C.L.Li
	<i>Vitis zhejiang-adstricta</i> P.L.Chiu
Tropiques	Europe
<i>Vitis balansana</i> Planch.	<i>Vitis vinifera</i> L.
<i>Vitis blancoi</i> Munson	
<i>Vitis bourgaeana</i> Planch.	
<i>Vitis flexuosa</i> Thunb.	
<i>Vitis labruscana</i> L.H.Bailey	
<i>Vitis luochengensis</i> W.T.Wang	
<i>Vitis peninsularis</i> M.E.Jones	
<i>Vitis pilosonerva</i> F.P.Metcalf	
<i>Vitis popenoei</i> J.H.Fennel	
<i>Vitis rotundifolia</i> Rom.Caill. ex Planch.	

1.1.2. Développement et Physiologie de la vigne

Le cycle végétatif de la vigne dans nos régions tempérées présente un rythme de croissance discontinu avec l'alternance de période de végétation et de repos (Figure 2).

Après un repos hivernal de fin novembre à février, période de sommeil au cours de laquelle la circulation de la sève cesse, la croissance végétative au printemps (mars/avril) démarre avec le débourrement des bourgeons, puis les rameaux s'allongent jusqu'à la fin juillet. Pour préparer la vigne aux conditions défavorables de l'hiver et assurer un nouveau cycle végétatif l'année suivante, les rameaux s'épaississent et durcissent grâce à un dépôt de lignine (aoûtement) qui précède la chute des feuilles (défeuillaison) et l'entrée en dormance.

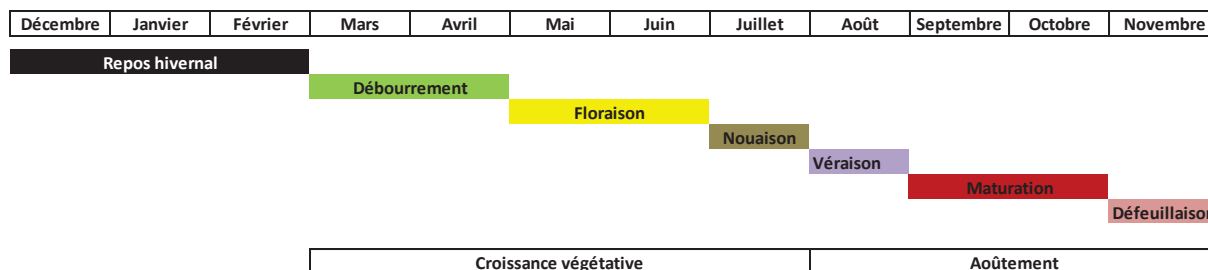
Le cycle reproducteur de la vigne est biennuel car l'initiation des primordia inflorescentiels se mettent en place l'année précédant l'année de fructification. Les boutons floraux apparaissent avec le débourrement des bourgeons et les inflorescences se développent. La floraison a lieu entre mai et juin et aboutit à la libération du pollen.

La vigne cultivée est une plante hermaphrodite (constituée de fleurs mâles et femelles à la fois). La fécondation d'une fleur peut être assurée par autofécondation ou par allogamie (fécondation d'une fleur distante) (Galet, 2000).

Dès que l'ovaire commence à se développer, la grappe se forme et le fruit est noué. Les baies ainsi formées vont grossir et atteignent environ 70% de leur taille finale et commencent à se toucher. Selon les cépages, la fermeture est plus ou moins lente et dans certains cas incomplète. À la fin de la nouaison, en juillet, la grappe atteint sa taille finale. Au mois d'août, les baies atteignent le stade de la véraison. Un changement de couleur des baies se met en place marquant la fin de la phase herbacée et le début de la maturation. Les raisins deviennent moins acides et s'enrichissent en sucre.

Les baies atteignent leur pleine maturité entre fin août et fin septembre, en fonction des cépages et peuvent être vendangées. Si les baies ne sont pas récoltées, il peut se mettre en place une sur-maturation caractérisée par un flétrissement des baies.

Figure 2: Cycle physiologique de la vigne



1.2. Importance de la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.)

Des restes fossilisés d'une vigne ont été découverts au cours de fouilles en Iran, au nord des monts du Zagros démontrant qu'elle est apparue durant l'ère tertiaire (paléocène), avant l'apparition de l'homme. Elle fût baptisée *Vitis Sezannensis*, espèce maintenant disparue.

Des découvertes archéologiques suggèrent que la domestication de la vigne date de 5000 ans, au sud du Caucase entre la mer Caspienne et la mer Noire, puis se serait étendue au sud-ouest du croissant fertile, dans les vallées de Jordanie et d'Égypte (Myles et al, 2011). La découverte de Zagros en Iran en 1993 de vases remplis de pépins de raisin datant de 7500 ans avant J.C. permet de supposer une pratique très ancienne de vinification (Michel *et al.*, 1993 et Mc Govern *et al.*, 1996). Mais c'est en Égypte qu'on trouva la plus ancienne représentation des procédés de vinification ainsi que des amphores contenant du vin blanc datant du III^{ème} millénaire avant J.C (Huetz de Lempis, 2001). Dans la Grèce antique, la vigne devint l'un des trois piliers de la triade méditerranéenne : céréales-olivier-vigne. La vigne fût implantée dans l'ensemble du bassin méditerranéen et en Gaule celtique à l'époque de la création de Marseille (600 ans avant J.C).

Tableau 3 : Les principales maladies de la vigne.

	Maladies	Agents pathogènes
Maladies cryptogamiques	Anthracnose	<i>Apiognomonina</i> spp.
		<i>Colletotrichum</i> spp.
		<i>Discula</i> spp.
		<i>Gloeosporium</i> spp.
		<i>Glomerella</i> spp.
		<i>Gnomonia</i> spp.
		<i>Pseudopeziza</i> spp.
	Black-rot	<i>Guirgnardia bidwellii</i>
	Brenner	<i>Pseudopezizula tracheiphila</i>
	Excoriose	<i>Phomopsis viticola</i>
Oïdium	<i>Erysiphe necator</i>	
Mildiou	<i>Plasmopara viticola</i>	
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i>	
ESCA		<i>Phaeoconiella chlamydospora</i> , <i>Fomitiporia punctata</i> , <i>Stereum rirsutum</i> , <i>Eutypa lata</i>
		<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
		<i>Botryosphaeria obtusa</i> , <i>Neofusicoccum parvum</i> , <i>Lasiodiplodia theobromae</i>
BDA		<i>Clonostachys rosea</i>
		<i>Diplodia seriata</i> et <i>Diplodia mutila</i>
		<i>Spencermartinsia viticola</i>
		<i>Botryosphaeria dothidea</i> , <i>Neofusicoccum luteum</i>
Eutypiose	<i>Eutypa lata</i>	
Insectes	Phylloxera	<i>Daktulosphaira vitifoliae</i>
	Vers de la grappe	<i>Lobesia botrana</i> (Eudémis), <i>Eupoecilia ambiguella</i> (Cochylis) et <i>Sparganothis pilleriana</i> (pyrale)
	Cicadelles	<i>Scaphoïdeus titanus</i> (Ball)
		<i>Empoasca vitis</i> <i>Metcalfa pruinosa</i>
Acariens	Acariens Rouges	<i>Panonychus ulmi</i> (Koch)
	Acariens jaunes	<i>Eotetranychus carpini</i> (Oudemans)
	Acariose	<i>Calipitimerus vitis</i>
	Erinose	<i>Eriophyes vitis</i>
Virus - bactéries et insectes vecteurs	Court-noué	GFLV (Grapevine Fan Leaf Virus) et <i>Xiphinema index</i>
		ArMV (Arabic Mosaic Virus) et <i>Xiphinema diversicaudatum</i>
	Maladie de Pierce	<i>Xylella fastidiosa</i> et <i>Homalodisca</i> spp.
	Bois noir	<i>Phytoplasma</i> spp. et <i>Hyalosthes obsoletus</i>
	Flavescence dorée	<i>Phytoplasma</i> spp. et <i>Scaphoïdeus titanus</i> (Ball)
	Enroulement	GRLaV (Grapevine leafroll-associated virus)

Le renforcement de la valeur attachée au vin apparut suite au déploiement du christianisme après l'anéantissement de l'Empire romain au cours du IV^{ème} siècle. Ainsi la liturgie de la communion pratiquée jusqu'au XIII^{ème} siècle a permis de maintenir et accroître la tradition viticole.

Au Moyen-Âge la qualité du vin s'améliora pour atteindre celle que nous connaissons aujourd'hui. L'expansion de la civilisation chrétienne fût à l'origine de l'expansion de la viticulture dans le monde.

En 2008, la superficie viticole mondiale a atteint 7742 milliers d'hectares (58,4% en Europe, 21,1 % en Asie, 12,8 % en Amérique, 5% en Afrique et 2,7% en Océanie), la production mondiale de raisin a atteint 677,9 millions de quintaux (43,2% en Europe, 26,5% en Asie, 21% en Amérique, 6% en Afrique et 3,3% en Océanie) et celle de vin a atteint 269 million d'hectolitres (66,7% en Europe, 5% en Asie, 18,5% en Amérique, 4,4% en Afrique et 5,4% en Océanie) (Extrait du rapport sur la situation de la viti-viticulture mondiale en 2008, présenté par Federico Castellucci, Directeur Général de l'OIV, à Zagreb, le 29 juin 2009).

En 2009, la France est redevenue le premier producteur mondial (44,75 millions d'hectolitres), devançant l'Italie (42,58 millions d'hectolitres), et l'Espagne (35,14 millions d'hectolitres).

En 2010, une baisse des superficies plantées est enregistrée (7586 milliers d'hectares) et la production mondiale a chuté de 5 % par rapport à celle de 2008 (645 millions de quintaux). La moitié de la production mondiale continue d'être assurée par trois pays : la France (44,9 millions d'hectolitres), l'Italie (44,84 millions d'hectolitres) et l'Espagne (33,9 millions d'hectolitres).

La vigne est propagée essentiellement par multiplication végétative, ce qui signifie que des variétés anciennes cultivées ont été propagées pendant des centaines, voire des milliers d'années, et peuvent aujourd'hui coexister avec des variétés cultivées produites par des croisements récents. L'adoption de ce mode de propagation de la vigne a ainsi contribué au maintien d'un haut niveau de diversité génétique de la plante et a permis la génération de clones avec des traits uniques. Cependant, le revers de telles pratiques est la contribution à la diminution de la motivation des viticulteurs à réaliser de nouveaux croisements et à créer de nouvelles variétés cultivées (Myles *et al.*, 2011).

1.3. Sensibilité de la vigne

La principale espèce de vignes cultivée en Europe (*Vitis vinifera* L.) est à l'origine de très nombreux cépages. La préoccupation constante des vignerons pour obtenir un état sanitaire optimal n'est apparue qu'à partir du XIX^{ème} siècle suite à trois vagues successives d'invasion de bioagresseurs ayant failli éliminer la vigne du paysage agricole français (oïdium, mildiou et phylloxera).

La vigne cultivée dans nos régions est très sensible à de nombreux bioagresseurs qui peuvent être d'origine cryptogamique, bactérienne, virale ou des ravageurs (Tableau 3) qui sont dommageables pour la récolte.

De nombreux parasites s'attaquent à la vigne et provoquent de graves dégâts (Tableau 3). Les champignons phytopathogènes représentent la majorité des bioagresseurs de la vigne.

- **L'Anthracnose** : due à différents champignons (*Apiognomonina*, *Colletotrichum*, *Discula*, *Gloeosporium*, *Glomerella*, *Gnomonia*, *Pseudopeziza*, *etc.*) largement répandue dans le monde entier, plus particulièrement dans les zones intertropicales.

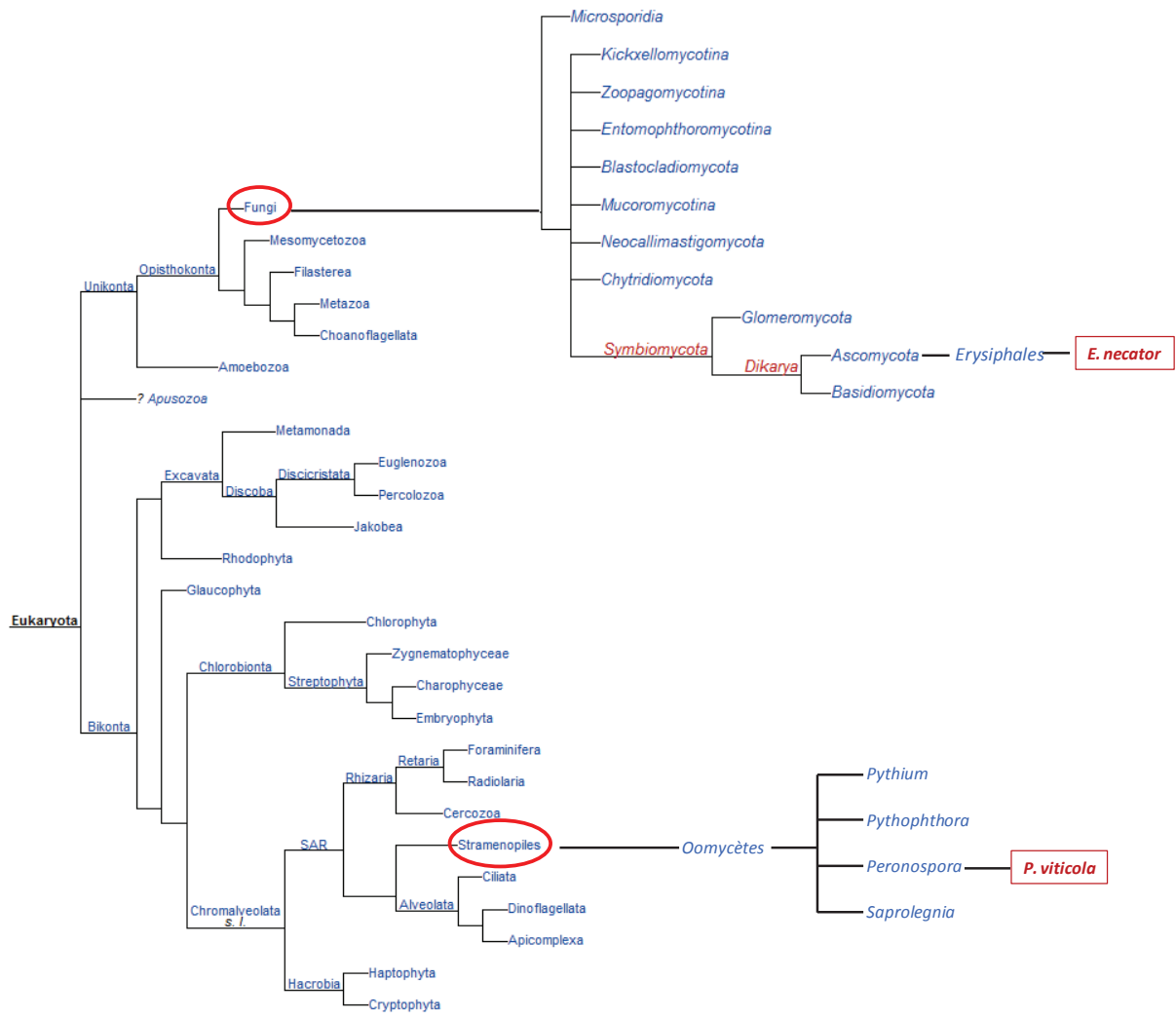


Figure 3 : Positionnement de *P. viticola* et *E. necator* dans la classification phylogénétique des Eucaryotes

Tableau 4: Classification de *P. viticola* et d'*E. necator*

	Mildiou	Oïdium
Domaine	Eukaryota	Eukaryota
Règne	Chromalveolata/Chromistes	Fungi
Division	Stramenopiles	Ascomycota
Embranchement	Oomycota	Septomycètes
Classe	Oomycetes	Ascomycètes
Ordre	Peronosporales	Erysiphales
Famille	Peronosporaceae	Erysiphaceae
Genre	<i>Plasmopara</i>	<i>Erysiphe</i> (ex <i>Uncinula</i>)
Espèce	<i>P. viticola</i>	<i>E. necator</i>

- **Le Black-Rot:** est causé par le champignon *Guignardia bidwellii*, originaire d'Amérique du Nord. Son apparition en Europe remonte au milieu du XIX^e siècle, et aux alentours de 1855 en France.
- **Le Brenner:** ou le rougeot parasitaire causé par le champignon *Pseudopezicula tracheiphila*,
- **L'Excoriose:** est provoquée par le champignon *Phomopsis viticola* qui fragilise les bois, présentent des cloques, des fendillements et des crevasses contenant des spores du champignon.
- **La Pourriture grise:** causée par *Botrytis cinerea*, un champignon nécrotrophe s'attaquant au raisin pendant sa maturation, responsable également de la pourriture noble qui est très recherchée pour la fabrication des vins liquoreux.
- **L'Esca-Black Dead Arm:** entraîne un dépérissement de la plante et s'attaque principalement aux vieilles vignes.

Parmi l'ensemble des maladies, aujourd'hui si les maladies de dépérissement telles que l'ESCA et le BDA préoccupent grandement la viticulture mondiale, les principales sont toujours le Mildiou, l'Oïdium et le Botrytis, des maladies cryptogamiques pouvant détruire la totalité de la récolte. Un bon programme de lutte efficace commence par une bonne identification des maladies. Le programme de la lutte engagée varie selon les conditions météorologiques, les cépages et l'abondance de l'organisme pathogène.

Une résistance directement liée au développement normal de la vigne est dite ontogénique. Elle apparaît dans les organes souvent âgés et confère de la résistance naturelle à plusieurs champignons pathogènes, incluant l'oïdium (Gadoury *et al.*, 2003), le mildiou (Kennelly *et al.*, 2005), et le black rot (Hoffman *et al.*, 2002). Ainsi le développement des maladies cryptogamiques comme le mildiou et l'oïdium est-il dépendant de l'âge des organes verts de la vigne. En fonction de l'âge de la feuille, la germination des conidies diminue et le temps de sporulation augmente. Concernant les grappes, leur sensibilité est moindre, dès 20 jours après la floraison et peu de symptômes seront observés sur les baies plus anciennes.

2. Agents pathogènes biotrophes de la vigne

2.1. *Plasmopara viticola* (Berk. & Curtis) Berlese & De Toni, (1888)

2.1.1. Biologie

Le Mildiou de la vigne est une maladie invasive originaire d'Amérique du Nord. Elle a été introduite en Europe avec des boutures de vignes américaines pour replanter les vignobles français détruits par le phylloxéra. Elle est apparue en France vers 1878 et fût identifiée par le Dr. Deluze pour la première fois et décrite en 1879 par Planchon en Gironde (Coultras). Elle est causée par un oomycète biotrophe, parasite obligatoire affilié aux algues brunes, *Plasmopara viticola* qui appartient au règne des Chromistes (ou *Chromalveolata*, Figure 3 et Tableau 4).

À l'automne, des oeufs d'hiver sont produits par reproduction sexuée (fécondation d'une anthéridie et d'une oogone), tombent sur le sol et constituent la forme de survie hivernale du champignon. Lorsque les conditions deviennent favorables au printemps (température et humidité), des macroconidies germent, issues des oeufs d'hiver, se développent et libèrent des spores munies de flagelles (zoospores) se déplaçant dans l'eau (Lafon *et al.*, 1981 et Galet, 1977).

CYCLE DE DEVELOPEMENT **MILDIU (*Plasmopara viticola*)**

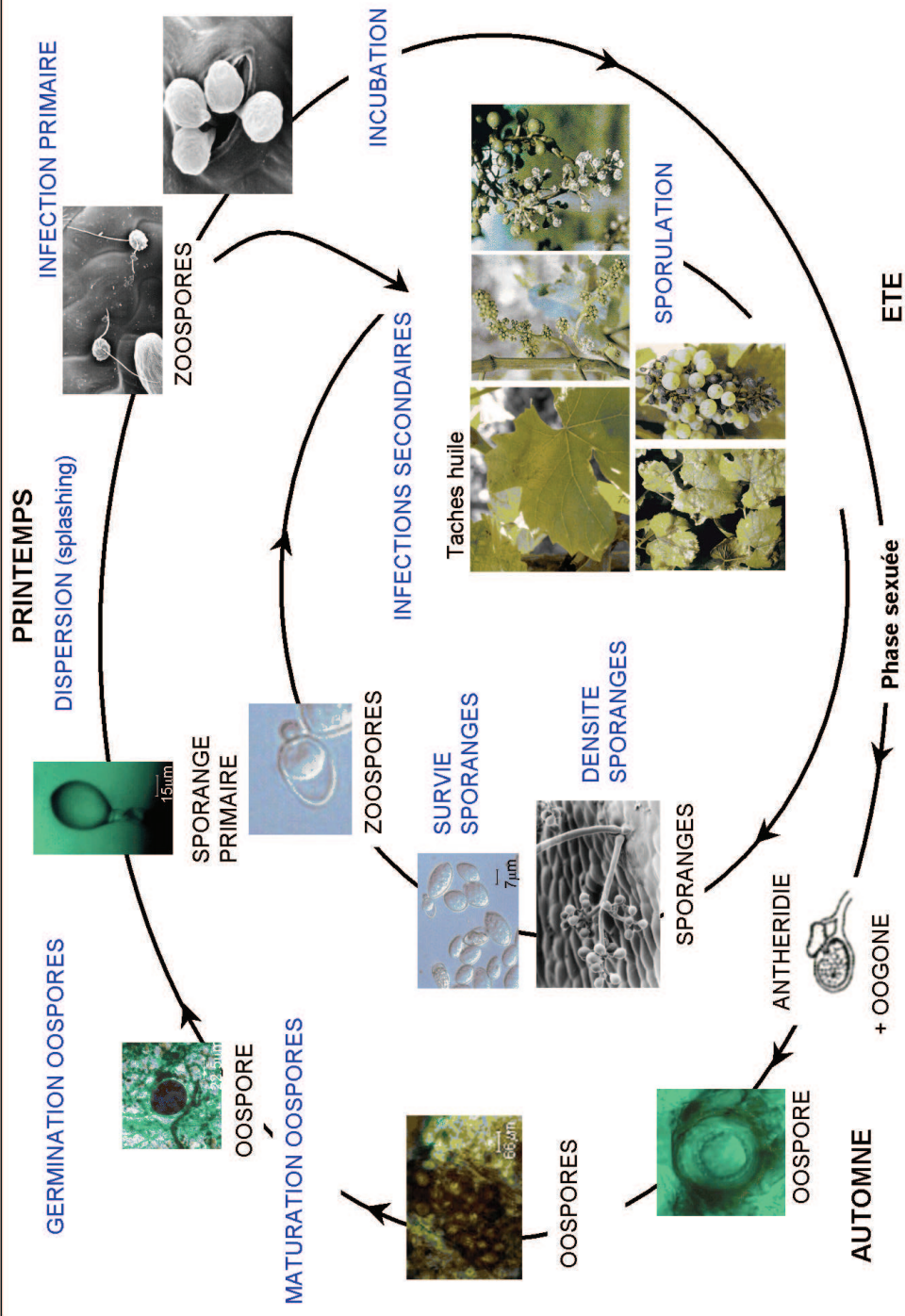


Figure 4: Cycle biologique de *Plasmopara viticola* (d'après Olivier Viret, ACW).

Les zoospores germent à leur tour, en produisant un tube germinatif qui pénètre par les stomates, se ramifie, s'insère entre les cellules et envoient des suçoirs intracellulaires (haustoria) pour se nourrir au dépend de la plante hôte. Pendant la période d'incubation (entre 5 à 8 jours), des symptômes foliaires typiques que l'on appelle la "tâche d'huile" à la surface supérieure des feuilles sont visibles (Figures 4 et 5). Ces taches jaunâtres, légèrement translucides, se couvrent ensuite, sur la face inférieure de la feuille, d'un duvet blanchâtre. À l'automne, sur les feuilles âgées, les taches sont limitées par les nervures et forment le symptôme de point de tapisserie : c'est le « Mildiou mosaïque » (Figures 4 et 5).

Après une latence de quelques jours, le mycélium sporulant émerge des stomates, produisant des sporanges portés par des sporangiophores, formant ainsi à la surface inférieure des feuilles un duvet blanchâtre. Emportés par le vent et la pluie, les sporanges sont à l'origine des infections secondaires qui favorisent ainsi l'extension de la maladie sur différents organes de la vigne.

2.1.2. Symptomatologie

La maladie a une incidence défavorable sur la production. En effet elle attaque tous les organes herbacés, provoque l'altération du feuillage et entraîne sa chute précoce ainsi que la destruction totale du raisin (diminution de la récolte). Les jeunes feuilles sont les plus vulnérables et une attaque précoce, grave peut provoquer une défoliation prématurée. Ainsi, les grappes, moins bien nourries, sont-elles de moins bonne qualité et l'aoûtement se fait-il mal, le tout conduisant à un affaiblissement du cep durant l'hiver et une mauvaise reprise de végétation l'année suivante. Une attaque plus tardive sur un feuillage adulte provoque des dégâts moins importants.

Avant floraison ou pendant la floraison, les attaques de mildiou induisent une coulure partielle ou totale des fleurons accompagnée du brunissement progressif de leur pédicelle et du pédoncule de la jeune grappe. Sur ces organes apparaissent des efflorescences blanchâtres. La fin de la floraison, au moment où les capuchons floraux tombent laissant à nu l'ébauche du jeune grain, est un stade particulièrement vulnérable. Si l'attaque se porte sur le pédoncule de la jeune grappe, celui-ci se déforme et prend une teinte verte-olivâtre, tandis que les fleurons de la partie terminale se dessèchent.

Les symptômes sur très jeunes baies se caractérisent par une teinte grise et se couvrent d'un feutrage blanc, c'est le rot gris (rot = pourriture, en anglais). Sur les baies de taille plus importantes, une teinte brune apparaît et on parle de "rot brun". Les grains se rident, pourrissent et tombent le plus souvent. L'attaque a aussi pour conséquence un affaiblissement général des sarments (c'est à dire une mauvaise lignification des jeunes rameaux avant l'hiver).

2.1.3. Diversité

Les populations de *P. viticola* nord-américaines sont considérées comme des populations fondatrices. Des analyses phylogénétiques sur un petit nombre d'isolats ont mis en évidence trois lignées distinctes (clades), l'un d'entre eux contenant des échantillons d'origine américaine et européenne tandis que les deux autres lignées contiennent uniquement des isolats américains (Chen *et al.*, 2007, Schröder *et al.*, 2011).

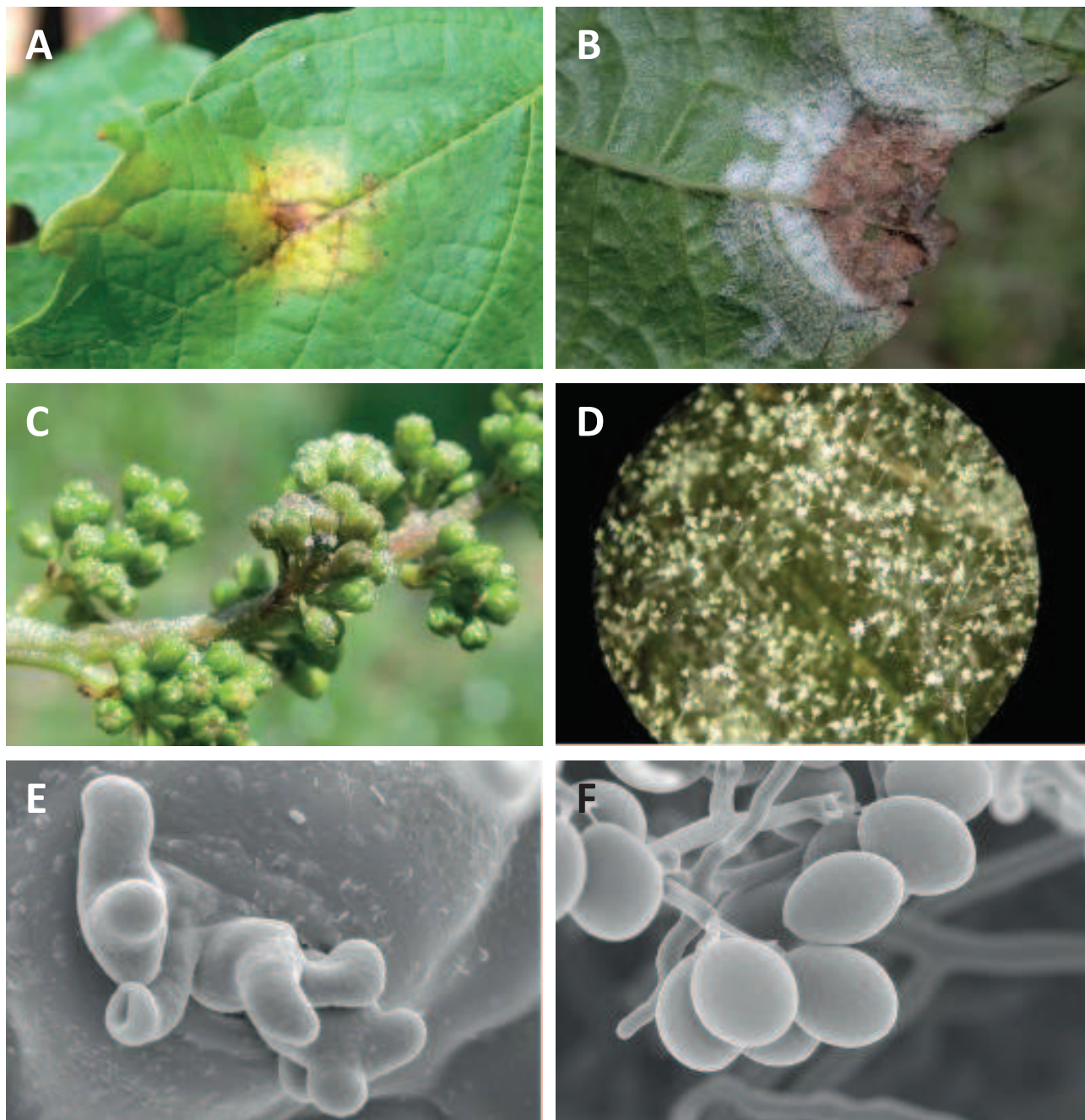


Figure 5: Observations macroscopiques et microscopiques du mildiou de la vigne : (A) symptôme « tâche d'huile » avec nécrose sur la face supérieure d'une feuille, (B) sporulation de *Plasmopara viticola* sur la face supérieure d'une feuille, (C) sporulation sur inflorescences avant floraison, (D) sporanges et sporangiophores de *Plasmopara viticola* (x 6,5), (E) sporangiophore sortant d'un stomate (TEM, x 2450), (F) sporanges sur sporangiophores (x 750), (Gessler *et al.*, 2011).

Les populations européennes de *P. viticola* présentent simultanément un niveau réduit de diversité génétique et une forte diversité génotypique. La plupart des populations européennes sont panmictiques indiquant que la reproduction sexuée est fréquente. Elles présentent également un léger isolement par la distance à l'échelle du continent (Gobbin *et al.*, 2006).

Les populations de mildiou trouvées en France présentent une grande variabilité phénotypiques avec des sensibilités différentes à plusieurs fongicides (Corio-Costet *et al.*, 2012). Une étude phylogénétique réalisée à partir d'une portion du génome mitochondriale (2281 pb) incluant le gène du cytochrome b a permis de démontrer l'existence de différents haplotypes mitochondriaux plus ou moins sensibles à certains fongicides (IS, IR, IIS, IIR) (Chen *et al.*, 2007, Corio-Costet *et al.*, 2011).

2.2. *Erysiphe necator* (Schwein.) Burrill

2.2.1. Biologie

L'oïdium de la vigne est une maladie introduite, originaire d'Amérique qui fut observée en France vers 1845, dont la cause est un champignon biotrophe *Erysiphe necator* (Schw. Burr.), anciennement nommé *Uncinula necator*, exclusif au genre *Vitis* (Figure 3). Cet agent pathogène appartient à l'embranchement des Septomycètes, à la classe des Ascomycètes, l'ordre des Erysiphales et à la famille des Erysiphacées. (Tableau 4). Son mycélium filamenteux et cloisonné, se développe uniquement à la surface des organes de l'hôte (Corio-Costet, 2007). Pendant la période de croissance végétative de la vigne, cet agent pathogène se reproduit de manière asexuée, sous forme de conidies qui sont dispersées par le vent, à la surface des feuilles de l'hôte en croissance (Figure 6 et 7). Il possède deux modes de conservation hivernale : soit il demeure sous forme de mycélium dormant dans les bourgeons et colonise les jeunes pousses au printemps (symptômes drapeaux), soit il réalise un cycle de reproduction sexuée par la fusion de deux hyphes de types sexuels compatibles et produit des Cleistothèces. La compatibilité sexuelle est régulée par des gènes situés sur un locus spécifique (locus *MATI*, Brewer *et al.*, 2011). Pour que deux individus hétérothallique soient compatibles et fusionnent, il faut que chacun d'entre eux possède une spécificité différente au locus "*MATI*" (*MATI.1* et *MATI.2*). Au printemps, les cléistothèces germent et les ascospores libérées provoqueront les infections primaires sur les feuilles en croissance. Ainsi, les feuilles colonisées fournissent-elles une source d'inoculum pour les baies en développement. Les feuilles sont sensibles à l'oïdium dès le stade première feuille déployée (stade 7) et les baies le sont dès leur formation jusqu'à la véraison. Une relation directe est observée entre la présence d'inoculum primaire sur les feuilles et les dégâts ultérieurs causés sur les grappes.

2.2.2. Symptomatologie

En termes de dégâts, comme pour le mildiou, la maladie a une incidence défavorable sur la production. En effet, cet ascomycète s'attaque à tous les organes verts de la vigne et en particulier aux jeunes baies en croissance (Figure 7). À l'époque du débourrement, les filaments du champignon contenus dans les bourgeons se développent et contaminent les jeunes organes verts (symptômes "Drapeaux").

Les symptômes les plus marquants au cours de la période végétative sont un aspect gaufré et boursoufflé des feuilles qui s'accroissent, bords relevés en forme de tuiles vers la face supérieure et une poussière blanchâtre envahit l'ensemble du limbe.

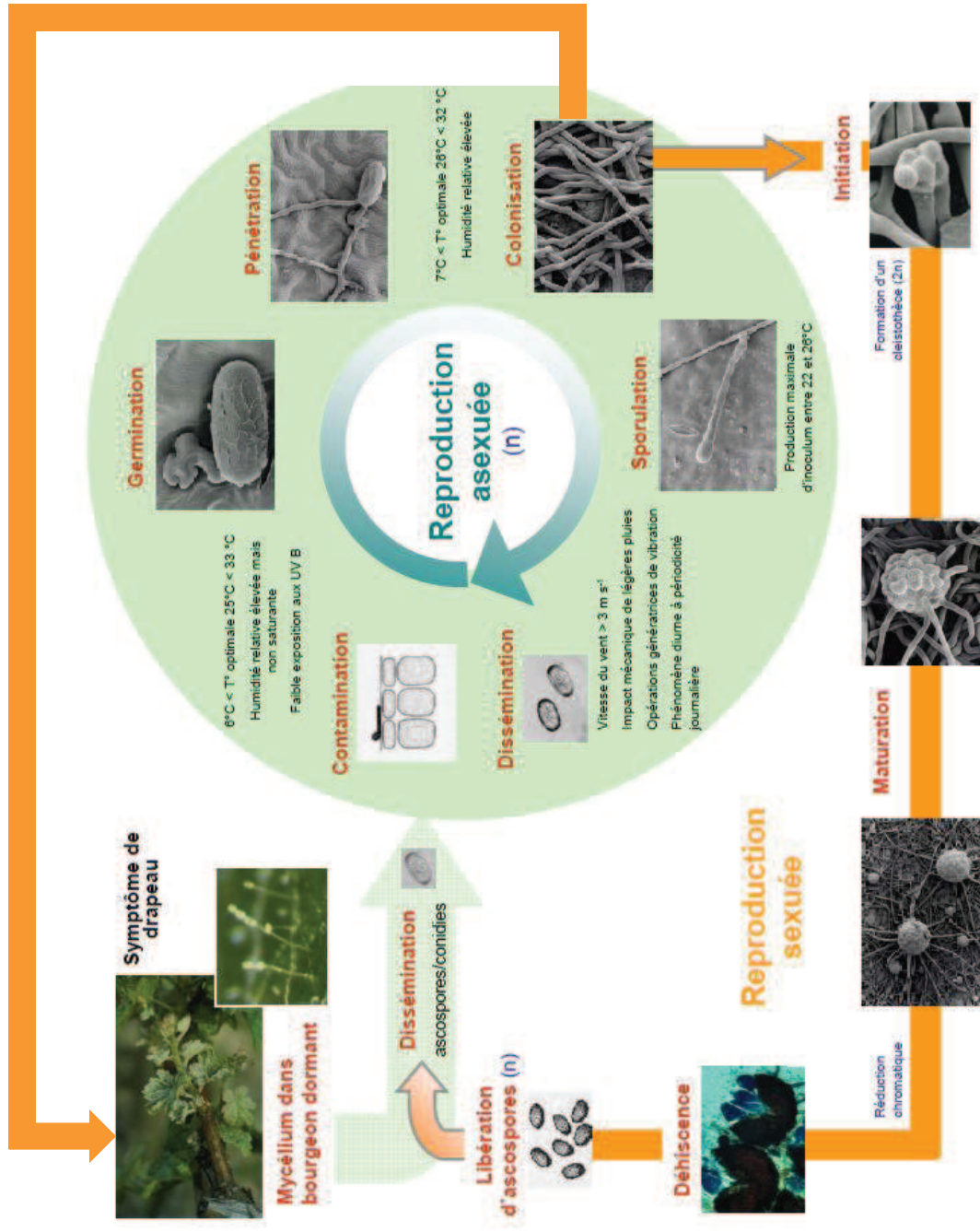


Figure 6 : Cycle biologique d'*E. necator* (d'après Schnee *et al.*, 2008).

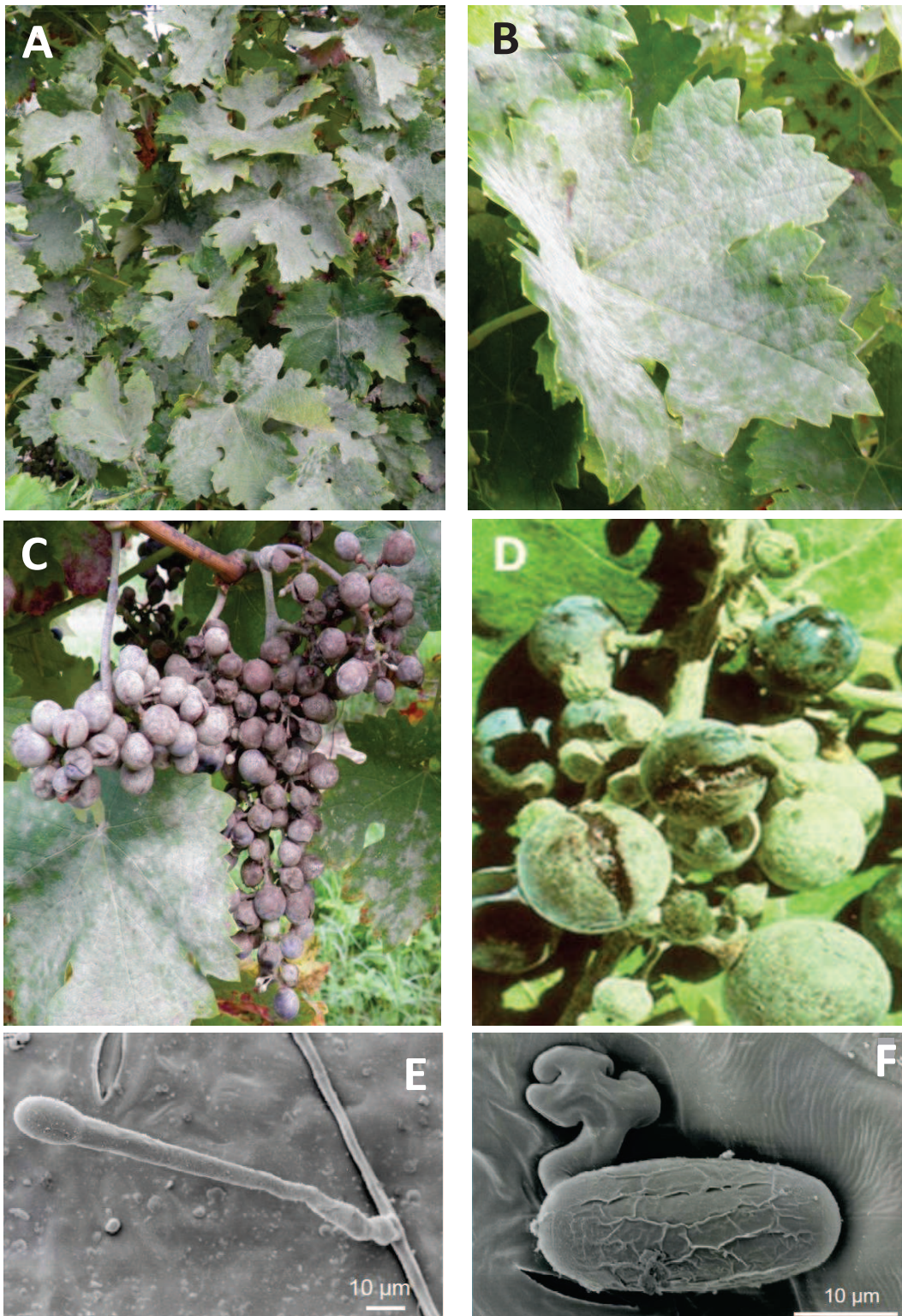


Figure 7: (A) symptôme oïdium sur feuille, (B) sporulation de *Erysiphe necator* sur la face supérieure d'une feuille formant une poudre blanchâtre, (C) attaque sur grappes, (D) attaque sur baies vertes provoquant un éclatement des baies (E) germination d'une conidie sur un conidiophore, (F) germination d'une spore (Photos de Dufour M. C. et d'après Schnee *et al.*, 2008).

Aux premiers stades de la contamination, des tâches translucides apparaissent pouvant ressembler, dans certains cas, à celles provoquées par *P. viticola* mais *E. necator* forme un feutrage sur les deux faces des feuilles.

Les fleurs peuvent aussi être contaminées puis se dessécher et tomber. Les grains se couvrent à leur tour d'une poussière blanchâtre; leur peau se durcit, se fendille et finit par éclater. La présence de grappes oïdiées lors des vendanges altère donc la qualité des vins obtenus (Calonnec *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'oïdium diminue fortement la récolte et, dans certains cas, peut même l'anéantir totalement, comme en 1852.

2.2.3. Diversité

En Europe et en Australie, deux groupes génétiquement distincts, A et B (ou I et III), ont été identifiés en raison de leur différenciation marquée avec des marqueurs génétiques semi-dominants (par amplification aléatoire d'ADN polymorphe) de type RAPD et AFLP, ou de polymorphismes nucléotidiques de type SCAR ou SNP (Delye *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1997 ; Stummer *et al.*, 2000 ; Miazzi *et al.*, 2003 ; Hajjeh, H. *et al.*, 2005 ; Peros *et al.*, 2005 ; Amrani et Corio-Costet, 2006 ; Núñez *et al.*, 2006). Récemment, une étude a révélé l'existence d'une diversité beaucoup plus importante sur le continent américain (Brewer *et al.*, 2010). Les deux groupes peuvent être présents sur une même parcelle, sous les différentes formes : mycélium dormant (A et B) ou cleistothèces (B en France).

Les populations d'oïdium responsables des symptômes "drapeaux" appartiennent majoritairement au groupe A et sont présentes généralement au début de l'épidémie. Les populations de groupe A présentent peu de diversité et la plupart des isolats possèdent le même type sexuel (Corio-Costet, 2007). À ce jour, les souches de groupe B, peuvent également être associées à des symptômes "drapeaux" et, seules les populations appartenant au groupe B semblent se reproduire de manière sexuée (Cortesi *et al.*, 2004, Peros *et al.*, 2006 et Bouscaut et Corio-Costet, 2007) et présentent une plus grande variabilité génétique (Corio-Costet, 2007). Toutefois, quelques études en Australie et en Italie suggèrent que les souches de groupe A peuvent réaliser un cycle de reproduction sexuée (Miazzi *et al.*, 2003 et Stummer *et al.*, 2006 et Frenkel *et al.*, 2011), mais les recombinants n'ont jamais été trouvés dans la nature à ce jour.

Les deux groupes sont associés à différentes niches temporelles et possèdent des exigences écologiques différentes (Délye et Corio-Costet, 1998 et Amrani et Corio-Costet, 2006). Les populations rencontrées dans la plupart des vignobles échantillonnés en Italie et en France sont composées du seul groupe B (Délye *et al.*, 1997 et Miazzi *et al.*, 2008) mais, lorsque les deux groupes génétiques se trouvent dans le même vignoble en début de saison, seul le groupe génétique B est retrouvé en fin de saison (Corio-Costet, 2007, Montarry *et al.*, 2009). La présence conjointe de ces deux populations dans ce cas a conduit à des erreurs d'interprétations d'observations sur la résistance aux fongicides (Corio-Costet, 2007). En effet, les populations A étant plus sensibles aux fongicides que les populations B, leur présence massive en début de saison, puis leur remplacement au cours de saison, a conduit à décrire une résistance disruptive (perte brutale de sensibilité au fongicide même si on augmente la dose). Ce qui n'était nullement le cas. Nous étions en présence de deux populations différentes exprimant temporellement des niveaux de sensibilité différents aux fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (Corio-Costet, 2007 et Dufour *et al.*, 2011).

Une comparaison des traits d'histoire de vie déterminant la fitness des deux groupes génétiques en Europe montrent que les souches de groupe A sont moins agressives que les souches appartenant au groupe B en terme de germination et d'efficacité d'infection. Par contre, les souches de groupe A sont plus agressives que celles de groupe B en terme de latence, de diamètre des lésions et du nombre de spores produites par lésion (Montarry *et al.*, 2009). Il a été précédemment observé une association forte entre les niveaux de sévérité de la maladie à la fin de la saison et les compositions initiales des populations d'*E. necator* dans 13 vignobles commerciaux (Montarry *et al.*, 2008). La colonisation rapide et extensive des plants par les isolats de groupe B est associée à des cas de maladies les plus sévères.

3. Protection du vignoble

Pour obtenir un état sanitaire optimal et une production de qualité, les viticulteurs ont recouru à de nombreux traitements fongicides, bactéricides ou insecticides, lesquels conduisent à des problèmes environnementaux : santé humaine, pollution, acquisition d'allèles de résistance aux fongicides dans les populations de pathogènes par exemple.

L'identification précoce et rapide des maladies présentes dans le vignoble est indispensable afin de prévenir des infestations graves et des pertes de rendement ou de qualité. Cependant, l'application d'un traitement à chaque détection de la présence d'un agent pathogène n'est pas nécessaire car en fonction des conditions climatiques, de l'inoculum présent (historique de la maladie) et de la sensibilité des cépages, la sévérité de la maladie peut varier. Il faut évaluer la probabilité de l'état dévastateur ou non de la maladie et adapter les mesures à prendre pour éviter les pertes de récolte.

Il existe donc plusieurs stratégies d'application des fongicides :

- Lorsqu'un risque minimum est recherché, les fongicides peuvent être appliqués en fonction d'un calendrier prédéfini.

- La décision d'application d'un traitement peut être également prise grâce à des modèles de prévision des risques en fonction d'observations recueillies dans le vignoble (conditions climatiques, stade de développement de la vigne, du cépage, de la pression parasitaire et de l'historique des dommages).

- En intégrant l'application combinée et rationnelle des mesures disponibles (biologiques, biotechnologiques, chimiques, physiques ou culturelles) conduisant à une utilisation des produits phytosanitaires limitée au strict nécessaire et en acceptant un dommage ou une perte économiquement acceptable, il est également possible de mettre en place une protection intégrée généralement plus économe en intrants chimiques.

3.1. Lutte anti-mildiou

La vigne est sensible au mildiou dès le stade de la première feuille déployée et les baies perdent leur sensibilité environ 3 semaines après la floraison. En général, le mildiou apparaît en début de saison et peut réapparaître en fin de saison sur les pousses en croissance. La stratégie d'intervention contre le mildiou consiste à protéger le feuillage lors des périodes à risque et de bien contrôler les dommages sur feuille avant la floraison pour éviter les dommages sur les baies.

3.1.1. Lutte préventive

Avant la plantation, il faut choisir un endroit bien drainé avec une bonne circulation de l'air, privilégier une orientation qui favorise une bonne ventilation et un bon ensoleillement, soit sud-est ou sud-ouest, choisir si possible des variétés peu ou modérément sensibles aux principales maladies (mildiou, oïdium, botrytis), choisir un système de conduite et un espacement qui favorise l'aération et le séchage rapide du feuillage et des baies. Un enherbement à l'aide de gazons à croissance lente sans rhizomes (comme les fétuques) peut également ne pas favoriser le développement de la maladie. Pour les plantations sur paillis plastique, utiliser des paillis plastique de la bonne qualité (Galet, 1977 et Dubos, 2002).

Des programmes d'amélioration variétale de vigne de cuve résistantes et de qualité ont été menés à la fin du 20^{ème} siècle. Les croisements effectués entre les variétés sensibles de *Vitis vinifera* et des espèces de *Vitis* américaines (*Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*...) résistantes aux principaux bioagresseurs ont permis d'obtenir des hybrides producteurs directs destinés à travailler la vigne plus simplement comme avant l'arrivée du phylloxera : pas de greffe et multiplication par simple bouturage et culture sous faible pression fongicide (Villard blanc ou noir, Chambourcin, Plantet, Bronner, Regent, Solaris, Merzling, Seyval Blanc, etc...).

Des recherches menées à l'INRA de Colmar, de créations variétales ont démarré en 2000, par la réalisation des croisements entre *Vitis vinifera* et la muscadine (*Muscadinia rotundifolia*) pour la création de nouveaux hybrides résistants au mildiou et à l'oïdium de la vigne.

3.1.2. Mesures prophylactiques

La stratégie de lutte doit être adaptée aux risques très dépendants des conditions climatiques. Pour réduire le plus possible la formation de foyers primaires, il est indispensable de supprimer les conditions favorables à leur développement (humidité et drainage) en éliminant la végétation près du sol (épamprage ou désherbage), en maîtrisant la vigueur de la vigne (taille, fertilisation, enherbement, palissage et rognage soigné) (Galet, 1977).

En enfouissant ou en détruisant les débris abritant les organismes pathogènes, en effectuant un bon contrôle des mauvaises herbes il est possible de réduire l'humidité dans la partie inférieure de la vigne ainsi que la compétition pour l'eau et les éléments nutritifs du sol. De même, en maintenant un bon programme de fertilisation tout en évitant les excès d'engrais azotés qui encouragent la croissance rapide de pousses tendres plus sensibles à certaines maladies, ou en effectuant une taille qui favorise l'aération (séchage du feuillage plus rapide) et une bonne pénétration des fongicides (exemples : taille ouverte, rognage, placement des sarments), il est possible de limiter, dès le début de la saison, la croissance des populations de mildiou et les risques d'épidémiques (Galet, 1977).

3.1.3. Lutte chimique

La gestion de cette maladie est encore largement basée sur l'utilisation de produits chimiques. En France, il existe une large gamme de produits qui peuvent être utilisés, environ 58 produits, couvrant 8 modes d'action différents (Corio-Costet M.F., 2012) (Tableau 5).

Tableau 5: Classification des composés utilisés en France pour lutter contre *P. viticola* en 2010 (d'après Corio-Costet, 2012).

Mode d'action	Classe Chimique	Noms communs (date d'autorisation)	Résistances décrites de <i>P.</i> <i>viticola</i>
Multi-site	Inorganics	Oxychlorure de cuivre, sulfate de cuivre,	Non
		Oxyde cuprique, Hydroxide de cuivre	Non
	Dithiocarbamates	Mancozeb (1961), maneb (1958),	Non
		Metiram-Zn (1958), Propineb (1963)	Non
	Phthalimides	Captan (1952), Folpel (1952)	Non
	Phthalonitriles	Chlorothalonil (1964)	Non
	Quinones	Dithianon (1963)	Non
	Phosphonates	Fosetyl-Al (1977)	Non
Eliciteurs	Cyanoacetamide oximes	Cymoxanil (1976)	Non
Inconnus			
Inhibiteurs de l'ARN polymérase (phenylamides)	Acyalanines	Benalaxyl (1981), Mefenoxam or Metalaxyl-M (1998)	Oui
Inhibiteur de la Respiration Mitochondriale (QoIs)	Methoxy-acrylates (strobilurins)	Azoxystrobin (1992), Pyraclostrobine (2003)	Oui
QiI + phosphonates	Oxazolidine-diones	Famoxadone (1996)	Oui
Synthèse de la paroi cellulaire	Cyano-imidazoles	Cyazofamide (2010)	Non
	Valinamide carbamates	Benthiavalcab-isopropyl (2009), Iprovalicarbe (1999), Valifenalate (2010)	Oui ?
	amides d'acide mandelique	Mandipropamid (2009)	Oui
	amides d'acide cinnamique	Dimethomorph (1988)	Oui
Biosynthèse des microtubules	Benzamides	Zoxamide (2003)	Non

La lutte contre le mildiou consiste à pulvériser des fongicides de contact préventivement, et à utiliser des fongicides pénétrants ou systémiques, qui ont un effet curatif, lorsque les conditions sont particulièrement favorables et que le risque de contamination est fort. Dans tous les cas, il est conseillé de toujours utiliser les composés pénétrants ou systémiques en combinaison avec des fongicides de contact (Gisi, 2002).

Les fongicides ayant un mode d'action multi-site sont polyvalents et affectent divers processus cellulaires (respiration, perméabilité et division cellulaires) et inhibent généralement la germination des spores. Ils sont largement utilisés en préventif, et à ce jour, il n'existe pas de résistance connue aux fongicides multisites.

Les phosphonates ont un mode d'action complexe contre les Oomycètes, impliquant à la fois des effets directs et indirects, avec une stimulation forte et rapide des mécanismes de défense des plantes (Smillie *et al.*, 1989 ; Guest and Grant, 1991 ; Jackson *et al.*, 2000 ; Hardy *et al.*, 2001 ; Daniel *et al.*, 2005).

Les fongicides uni-sites ont un spectre d'action spécifique. Ils sont généralement pénétrants (translaminaires ou systémiques) et sont utilisés en préventif et curatif.

Les phénylamides (inhibiteurs de l'ARN polymérase) ont une activité exclusive contre les Péronosporales (Fisher et Hayes, 1979) mais des résistances contre ces molécules sont apparues rapidement.

Les QoIs (Quinone outside Inhibitors) inhibent l'oxydation du Coenzyme Q situé à la surface externe du cytochrome b, sur le complexe III des chaînes respiratoires des mitochondries. Ces fongicide uni-site sont utilisés en préventif et soumis à restriction à cause du développement de résistance chez le mildiou (Corio-Costet *et al.*, 2008).

Les QiIs (Quinone inside Inhibitors) inhibent l'oxydation du Coenzyme Q situé à la surface interne du cytochrome b, sur le complexe III des chaînes respiratoires des mitochondries. Ces fongicides présentent un haut niveau d'efficacité contre les Oomycètes et sont utilisés en préventif. Récemment introduits, le risque de résistance est élevé.

Les fongicides interférant sur la biosynthèse de la paroi végétales (Blum *et al.*, 2010) sont des fongicides uni-sites ayant pour cible la cellulose synthase, pour lesquels également, des phénomènes de résistance sont décrits (Corio-Costet, 2012).

Les benzamides inhibent la biosynthèse des microtubules et empêchent la division cellulaire en agissant sur les microfilaments de tubuline conduisant à un arrêt de l'élongation des tubes germinatifs et rend la pénétration du champignon dans la plante hôte impossible. À ce jour, aucun phénomène de résistance n'a été décelé.

3.1.4. Lutte raisonnée

Les traitements fongicides sont effectués en fonction du risque de développement de la maladie. Ce risque est estimé en fonction de la sensibilité du cépage, du dépistage, de l'historique de la maladie dans le vignoble, du stade phénologique, des conditions météorologiques, du temps écoulé depuis la dernière pulvérisation, du fongicide utilisé et de la croissance de la vigne.

Le choix d'un traitement dépend du niveau d'infestation et du stade phénologique de la vigne (le degré de risque). Lors de la croissance végétative de la vigne (en début de saison), l'utilisation de traitements à effets systémiques seront privilégiés si les risques deviennent élevés alors que des traitements de contacts suffiront si les risques sont faibles.

Lors de la floraison et nouaison, période de grande sensibilité de la vigne, les traitements devront être renforcés en utilisant des produits systémiques ou pénétrants (Galet, 1977). Après la fermeture de la grappe, période de moindre sensibilité de la vigne, les traitements seront nécessaires en cas de conditions climatiques favorable au développement du mildiou (humidité). L'application des traitements ne doit débuter qu'en présence de foyers primaires de la maladie et se poursuivre en fonction de la pression de maladie et des prévisions météorologiques propres à chaque exploitation et se termine en général au début de la véraison.

Grâce à l'élaboration de modèles de prévisions et d'outils d'aide à la décision, le viticulteur sera amené à traiter mieux lorsque c'est nécessaire (présence de symptômes, conditions climatiques favorables et sensibilité du cépage) afin d'éviter les risques liés à une utilisation intensive et systématique des fongicides et optimiser ainsi leur efficacité.

Ainsi, le modèle MILVIT ("MILdiou" et "VITiculture") est-il un système d'avertissement développé en Europe qui permet la description qualitative et quantitative de l'évolution du mildiou, élaboré par la Sous Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux (SDQPV) et utilisé par les Services Régionaux de la Protection des Végétaux (SRPV) pour éditer les avertissements agricoles. Ce modèle prend en compte la phase asexuée du développement du mildiou et la germination des macroconidies issues des oospores au printemps.

MILSTOP, une variante récente de MILVIT, intègre en plus les données concernant la conservation des œufs d'hiver (pour les vignobles méridionaux).

Le modèle "Potentiels Systèmes" développé par l'Institut Français de la Vigne (IFV) de prévision des risques de mildiou, d'oïdium et de Black-rot, est un modèle climatique qui calcule, en fonction des conditions climatiques, le risque épidémique, proche du modèle MILVIT.

Le modèle "VitiMétéo-*Plasmopara viticola*" élaboré par Agroscope Changins-Wädenswil (Suisse-Allemagne) intègre chaque étape du cycle de développement de *P. viticola* à l'aide d'algorithmes spécifiques intégrés dans un modèle mathématique pour évaluer le risque épidémique.

Plus récemment, le Processus Opérationnel et de Décision "Mildium" (POD Mildium) a été élaboré à l'Unité Mixte de Recherche Santé et Agroécologie du Vignoble de l'INRA de Bordeaux afin de proposer des méthodes et des outils innovants permettant d'exploiter la marge de manoeuvre existante dans la gestion des traitements fongicides, plus particulièrement ceux destinés à protéger la vigne contre le mildiou et l'oïdium (Naud *et al.*, 2011).

3.2. Lutte anti-oïdium

Les feuilles de vigne sont sensibles à l'oïdium dès le stade première feuille déployée et les baies sont sensibles de leur initiation à la véraison. La période à risque s'étale du stade 4 - 6 feuilles déployées jusqu'à la véraison. En général, l'oïdium apparaît avant la floraison et se développe tout au long de la saison sur le feuillage. Les premières infections se déroulent au printemps.

Si les conditions météorologiques sont favorables (une durée de 4 heures à des températures de 6 à 24 °C), il est nécessaire de débuter les traitements fongicides dès l'apparition des premiers symptômes. La sensibilité à l'oïdium dépend également du cultivar.

Tableau 6: Classification des composés utilisés en France pour lutter contre *E. necator* en 2010 (d'après ACTA 2011).

Mode d'action	Classe Chimique	Noms communs	Résistance reportée de <i>E. necator</i>
Multi-site	Inorganics	Soufre	Non
	Sulfamides	Dichlofluamide	Non
	Dérivés du Phénol	Meptyl-Dinocap	Non
		Chlorothalonil (1964)	Non
		Dithianon (1963)	Non
Inhibiteurs de la respiration mitochondriale (QoIs)	Strobilurines	Azoxystrobine (1992), Krésoxim- méthyle	Oui
		Trifloxystrobine, Pyraclostrobine	Oui
Inhibiteurs de la signalisation (Protéines G)	Phénoxyquinoléines	Quinoxyfène, Proquinazid	Oui
Inhibiteurs de la Succinate Déhydrogénase (SDHI)	Carboxamides	Boscalide	Non
Inhibiteurs de synthèse de la membrane cellulaire			
- IBS de groupe I	Pyrimidines	Tébuconazole, Penconazole	Oui
	Triazoles	Fenbuconazole, Triadiménole, Cyproconazole, Tétraconazole	
	Formamides	Myclobutanil, Difénoconazole	Oui
	Pyridines		Oui
- IBS de groupe II	Spirocétalamines	Spiroxamine	Non
Eliciteur	Extraits végétaux	Fénugrec	Non
Inhibiteurs des protéines du cytosquelette	Benzophénones	Métrafénone	Non

3.2.1. Méthodes prophylactiques

Elle consiste à protéger le feuillage lors des périodes à risque et de bien contrôler les dommages sur les feuilles avant la floraison pour éviter les dommages sur les baies.

Le champignon se développe dès que la température atteint 10 à 12 °C, l'optimum se situant vers 25 °C. Une atmosphère chaude et humide et un temps couvert sont favorables à l'Oïdium ; les pluies orageuses d'été, de même que les nuits fraîches avec rosée et brouillards matinaux, sont propices à une recrudescence de la maladie. Afin de diminuer le risque d'attaque, il est nécessaire de maîtriser la vigueur du végétal en raisonnant la fertilisation azotée, les apports minéraux en utilisant l'enherbement, en améliorant l'aération des grappes et en diminuant l'entassement du végétal (Gadoury *et al.*, 2011).

3.2.2. Lutte chimique

La lutte contre l'oïdium est préventive ou curative durant la période de sensibilité de la vigne et repose sur l'utilisation de fongicides.

L'application consiste à empêcher la dissémination des contaminations primaires à l'aide de pulvérisations préventives et doit se concentrer sur deux périodes, la première au début de la croissance, et la seconde entre la floraison et le début de la maturation lorsque les grappes sont les plus exposées. Les grappes sont particulièrement vulnérables à la contamination immédiatement après la nouaison (baies mesurant 2–3 mm de diamètre) et jusqu'au stade de fermeture de la grappe.

De nombreux fongicides, organiques ou inorganiques sont utilisés pour contrôler l'oïdium de la vigne (Tableau 6).

Le soufre est largement utilisé au niveau mondial, de par son efficacité, son faible coût et l'absence de résistance. Le développement superficiel d'*E. necator* rend le pathogène très sensible à des applications topiques.

Les fongicides multi-sites de contact ou de surface sont principalement utilisés de façon préventive et affectent divers processus qui inhibent la germination des spores ainsi que la croissance du mycélium déjà installé superficiellement (action partiellement curative) et la formation des suçoirs. Il s'agit de produits lessivables (Tableau 6).

Les fongicides uni-sites sont semi-pénétrants ou pénétrants et possèdent une action préventive en inhibant la germination des spores et la formation des suçoirs. Ils s'utilisent à faibles doses.

Les fongicides systémiques de type inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS) inhibent pour la plupart la déméthylation des stérols (DMIs) et constituent l'un des groupes les plus importants. Ils sont utilisés pour contrôler une large gamme de maladies des plantes et agissent en inhibant l'activité de la stérol C14 α -déméthylase dépendante d'un cytochrome P450 (Corio-Costet, 2003).

Les inhibiteurs de la respiration mitochondriale (QoIs) ont pour cible le complexe III de la chaîne respiratoire (ubiquinone-cytochrome C réductase) et inhibent l'oxydation du Coenzyme Q situé à la surface interne du cytochrome b, sur le complexe III des chaînes respiratoires des mitochondries (Grasso *et al.*, 2002).

Une majorité de fongicides utilisée à ce jour sont des uni-sites et la résistance de l'oïdium peut se développer par simple mutation ponctuelle.

E. necator a subi la pression de nombreux fongicides incluant, les inhibiteurs de biosynthèse des stérols (SBI), en particulier les DMIs, et a conduit à l'apparition de souches d'oïdium résistantes dans différents pays (Corio-Costet, 2007). Le mécanisme de résistance est multigénique, mais avec un mécanisme majeur impliquant une mutation ponctuelle dans le gène codant pour la 14-éburicol déméthylase (*CYP51*, Numéro accession GenBank : U72658.2) d'*E. necator*. En effet, chez l'oïdium de vigne, une substitution d'un résidu phénylalanine par une tyrosine en position 136 (Y136F) dans le gène *CYP51* a été associée à un haut niveau de résistance à DMIs (Délye *et al.*, 1997).

Plus récemment, la résistance aux fongicides inhibiteurs de la respiration mitochondriale (QoI) a été détectée aux Etats Unis et en Europe (Baudouin *et al.*, 2008 et Dufour *et al.*, 2011).

3.2.3. Lutte raisonnée

Le raisonnement de la lutte chimique se base sur le positionnement du premier traitement, le choix des produits utilisés et leur cadence d'application (7 à 10 jours pour les produits de contacts, 12 à 14 jours pour les produits pénétrants ou systémiques) et comme pour le mildiou, des modèles de prévisions des risques et des outils d'aide à la décision sont disponibles permettant aujourd'hui de mieux raisonner la lutte anti-oïdium (POD "Mildium" de l'INRA de Bordeaux et "Potentiels Systemes" de l'IFV) (Leger *et al.*, 2010).

Par une observation fine de l'exploitation afin d'évaluer l'installation de la maladie le viticulteur décidera de l'opportunité d'une intervention précoce après évaluation des risques de maladie. En effet, les traitements dits "curatifs" de rattrapages sur grappes oïdiées sont le plus souvent inutiles et peu efficaces. Après le stade de fermeture de la grappe, il est judicieux de choisir des produits actifs à la fois contre l'oïdium mais aussi contre le mildiou pour limiter les attaques sur feuilles. Le choix d'une stratégie dépend également de l'historique de la parcelle. Pour des parcelles sensibles ayant développé des symptômes "drapeaux", il est indispensable de réaliser des traitements de couverture systématiques jusqu'à la fermeture des grappes tandis que sur des parcelles peu sensibles ou sans antécédent, la protection devra être plus restreinte, du stade "boutons floraux séparés" à "fermeture des grappes".

3.2.4. Lutte biologique

Ces dernières années, de nouvelles méthodes de lutte sont à l'étude. La lutte biologique utilisant des champignons mycoparasites (*Ampelomyces quisqualis*) ou des traitements éliciteurs induisent des mécanismes de résistance aux maladies constituent de nouvelles méthodes de contrôle de l'oïdium. Toutefois, en dépit de la preuve des avantages potentiels de ces stratégies alternatives, des incohérences dans les performances sur le terrain ont été fréquemment rapportées.

Ampelomyces quisqualis est un champignon hyperparasite naturel de l'oïdium. Il infecte et forme des pycnides (fructifications) dans les hyphes, les conidiophores, et les cléistothèces. Ce parasitisme réduit la croissance du champignon et peut éventuellement tuer la colonie de champignon. *A. quisqualis* a été l'objet de nombreuses recherches pour lutter contre l'oïdium depuis plus de 50 ans (Falk *et al.*, 1995 ; Kiss *et al.*, 2010).

4. Interaction hôte-pathogène

Dans leur environnement, les plantes sont régulièrement soumises à des attaques variées d'agents pathogènes (champignons, bactéries, virus,...). Toutefois, la maladie représente une situation d'exception. Au cours de l'évolution, pour faire face à la diversité des agents pathogènes, les végétaux ont mis en place des mécanismes de défense permettant à la plupart d'entre-eux de lutter contre les infections de très nombreux bioagresseurs (Lyon, 2007). Toutefois à l'instar de ce que nous observons pour les fongicides et la résistance évolutive des agents pathogènes, les interactions hôte-pathogènes sont une course continue de lutte entre l'hôte et l'agent pathogène.

Lors de la résistance de la plante, plusieurs types de réponses peuvent être mis en place. Les réponses se différencient par les mécanismes mis en jeu mais surtout par leur rapidité et leur localisation :

- la réponse dite d'hypersensibilité (HR), similaire au processus de mort cellulaire programmée (apoptose), qui déclenche des nécroses cellulaires et confine l'agent pathogène au niveau du site d'infection ;

- la résistance locale induite (LAR) qui est mise en place au niveau du site d'infection suite à des modifications métaboliques et induit une résistance dans les cellules proximales ;

- la généralisation des mécanismes, mis en jeu lors de la LAR, qui conduit à la mise en place de la résistance systémique acquise au niveau de la plante entière (SAR).

Trois processus se retrouvent généralement impliqués dans la mise en place des mécanismes de défenses (Walters *et al.*, 2007), la perception, la signalisation et la réaction.

4.1. Reconnaissance du pathogène

4.1.1. Eliciteurs généraux

La reconnaissance d'un agent pathogène par la plante est initiée par la perception de molécules appelées éliciteurs ou de molécules associées au pathogène (Pathogen Associated Molecular Pattern ou PAMP et Microbe Associated Molecular Pattern ou MAMP) provoquant l'induction des mécanismes de défenses basales (PTI : PAMP-Triggered Immunity, Figures 8 et 9). Ces signaux peuvent avoir une origine exogène lorsqu'ils proviennent du pathogène, ou endogène lorsqu'ils sont produits par la plante. Leurs natures sont très variées (oligomères de chitine ou β -glucanes pour les éliciteurs fongiques, la cryptogéine de nature polysaccharidique, la flagelline d'origine bactérienne de nature protéique ou l'ergostérol de nature lipidique) et ils représentent donc des molécules d'intérêt pour lutter contre les bioagresseurs des plantes (Lyon, 2007).

4.1.2. Eliciteurs spécifiques : modèle gène pour gène

La résistance de la plante dépend également de la reconnaissance d'un produit d'un gène d'avirulence (éliciteur race-spécifique) issu du pathogène et le produit d'un gène de résistance de la plante selon le modèle récepteur-ligand (Keen, 1990).

Les agents pathogènes ayant contourné la première ligne de défenses basales (PTI) sécrètent des effecteurs qui peuvent à leur tour être reconnus et des réactions de défenses sont mises en place (Effector-Triggered- Immunity : ETI, Figures 8 et 9).

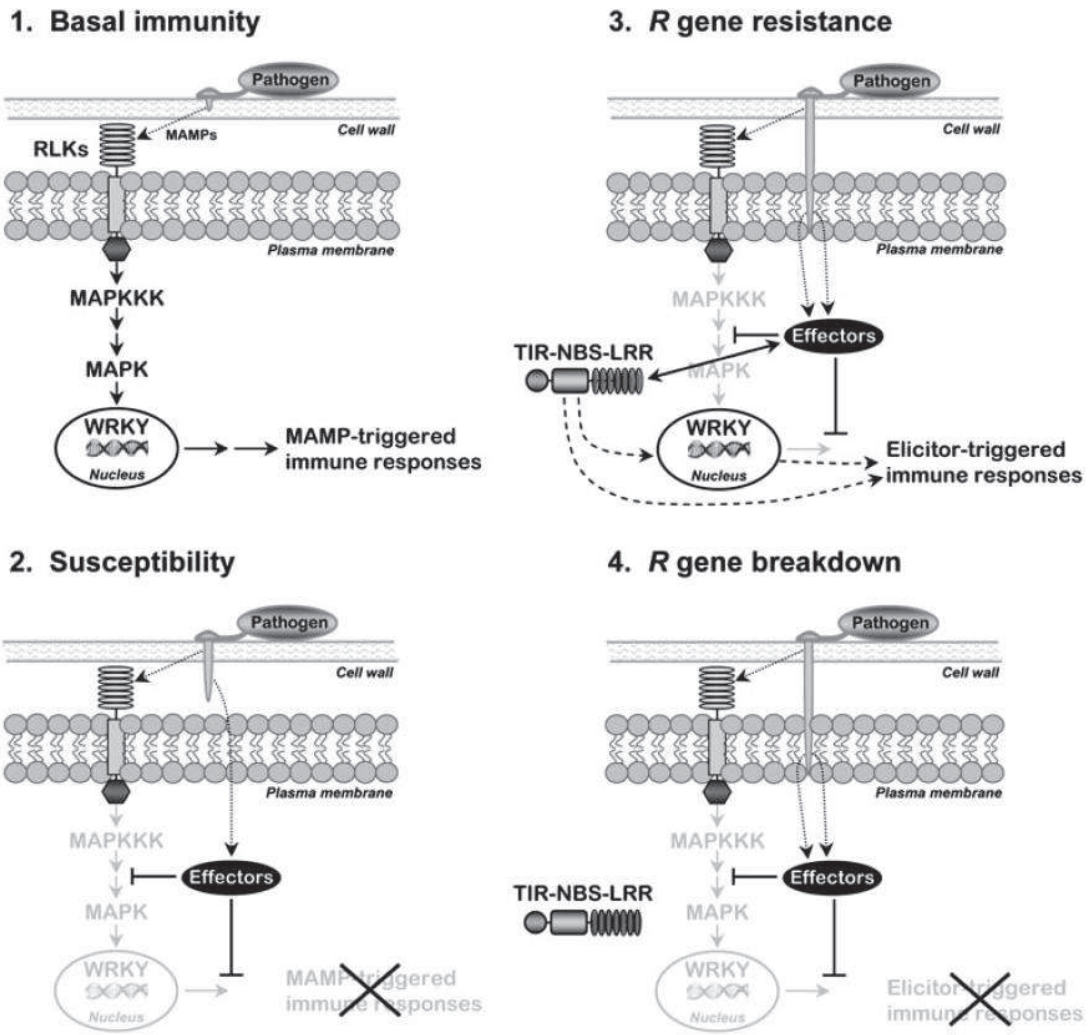


Figure 8 : Modèle de l'évolution de la résistance aux pathogènes des plantes (d'après Dry *et al.*, 2010). Étape 1: La reconnaissance des motifs moléculaires associés aux microbes (MAMP, tels que la chitine fongique) par un récepteur extracellulaire- like kinase (RLKs) déclenche l'immunité basale (PTI). Étape 2: Adaptation des pathogènes pour supprimer les réponses de défense basales *via* la libération de molécules effectrices, permettant la pénétration de la paroi cellulaire. Étape 3: les produits des gènes de Résistance de la plante, tels que TIR-NBS-LRR (TIR : domaine récepteur Toll/Interleukin-1; NBS : domaine du site de fixation des nucléotides; LRR : domaine leucine-rich repeat) reconnaissent les effecteurs et rétablissent la résistance (ETI). Étape 4: Le pathogène contourne la résistance en modifiant ou en éliminant les facteurs qui déclenchent ces défenses.

Les gènes d'avirulence sont également décrits comme des effecteurs sécrétés par le pathogène (Bent *et al.*, 2007). La plupart des gènes de résistance impliqués dans l'ETI appartiennent à une famille de protéines qui partagent des motifs structuraux communs possédant un domaine riche en leucine (LRR : Leucine-Rich Repeat) et un domaine qui se lie à l'ADN (NBS : Nucleotide Binding Site) associés à un domaine variable qui présente des propriétés communes avec le récepteur Toll-Interleukine 1 de la drosophile (TIR) ou un motif Coiled-coil (CC) des facteurs d'élongation des mammifères (Figures 8 et 10) (Dangl et Jones, 2001 ; Dry *et al.*, 2010).

Un contournement de la résistance peut avoir lieu suite à l'évolution de l'agent pathogène qui modifie ou élimine l'effecteur qui déclenche les défenses (Figure 8). De tels changements dans les effecteurs pathogènes doivent toujours être compatibles avec son rôle de facteur de virulence (Dry *et al.*, 2010). La résistance sera rétablie grâce à l'introduction d'un nouveau gène de résistance, qui reconnaîtra soit l'effecteur modifié soit un autre effecteur.

La résistance peut être classée en deux catégories: une résistance qualitative conférée par un seul gène de résistance et la résistance quantitative contrôlée par de multiples facteurs génétiques.

4.2. Voies de signalisation impliquées dans la mise en place des mécanismes de défense de la plante

Les immunités induites (PTI ou ETI) activent une grande variété de mécanismes de défense qui font intervenir des mécanismes de défenses passives, limitant l'entrée ou la progression du pathogène dans la plante mais également des mécanismes de défenses actives qui empêchent le développement du pathogène en le confinant au site de l'infection ou provoquant sa mort. (Figure 11).

Les réponses cellulaires précoces les plus fréquentes sont des mécanismes de modifications de flux ioniques (influx de Ca^{2+} , efflux de Cl^- et K^+), de production de formes actives de l'oxygène (ROS) et des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation (mitogen-activated protein kinase ou MAPKKK, MAPKK et MAPK) (Figure 12) (Zhao *et al.*, 2005 et Walters *et al.*, 2007)

4.2.1. Le flux ionique

Les réponses les plus précoces des cellules végétales se situent au niveau de la membrane plasmique où des modifications de perméabilité provoquent des échanges d'ions entre les milieux intra et extracellulaires, pouvant impliquer des protéines G, liées au récepteur membranaire qui interviennent dans la transduction précoce du signal en utilisant le guanosine diphosphate (GDP) ou triphosphate (GTP). Ces changements incluent des influx de Ca^{2+} et de H^+ et des efflux de K^+ , Na^+ et Cl^- par des canaux ioniques (Zhao *et al.*, 2005). Le Calcium semble jouer le rôle de messager secondaire pour l'ouverture des canaux ioniques et l'activation des protéines Kinases calcium-dépendantes (Figure 12).

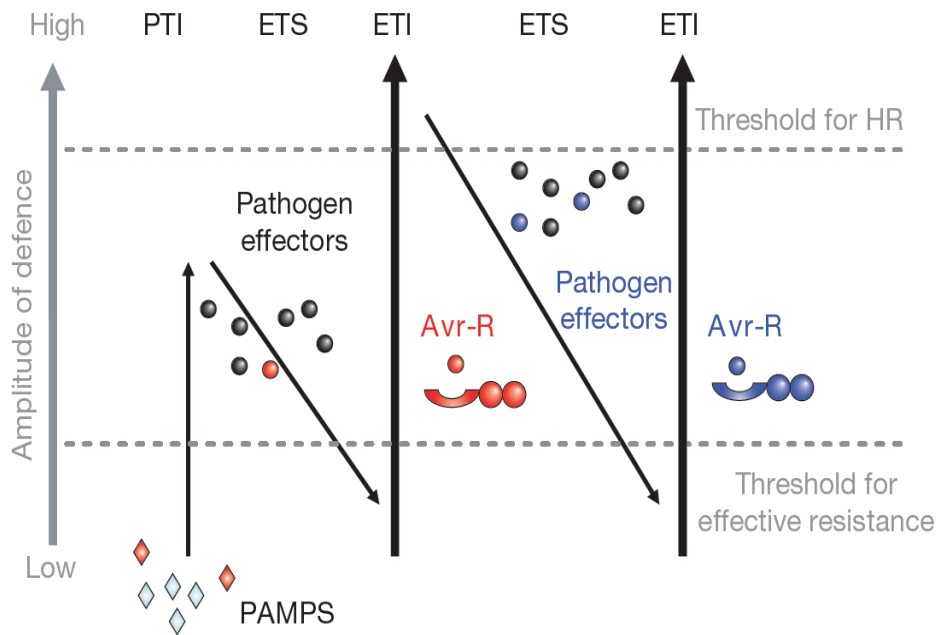


Figure 9 : Modèle en Zig-Zag illustrant les mécanismes de défense mis en place contre les pathogènes (d'après Jones et Dangl, 2006). **ETI :** Effector-Triggered- Immunity ; **ETS :** Effector-Triggered-Sensibility ; **PTI :** PAMP-Triggered-Immunity ; **PAMP :** Pathogen Associated Molecular Pattern; **Avr-R:** gène d'avorulence.

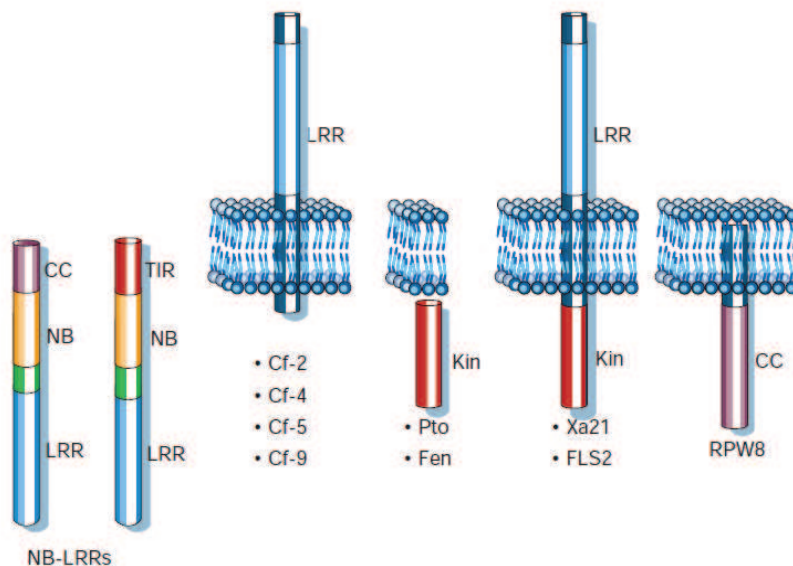


Figure 10 : Représentation de la localisation et de la structure des cinq classes principales de récepteurs impliqués dans l'ETI (d'après Dangl et Jones, 2001). **CC :** Coiled Coil; **NB :** Nucleotide Binding ; **LRR:** Leucine Rich Repeat; **TIR:** Toll Interleukine Receptor.

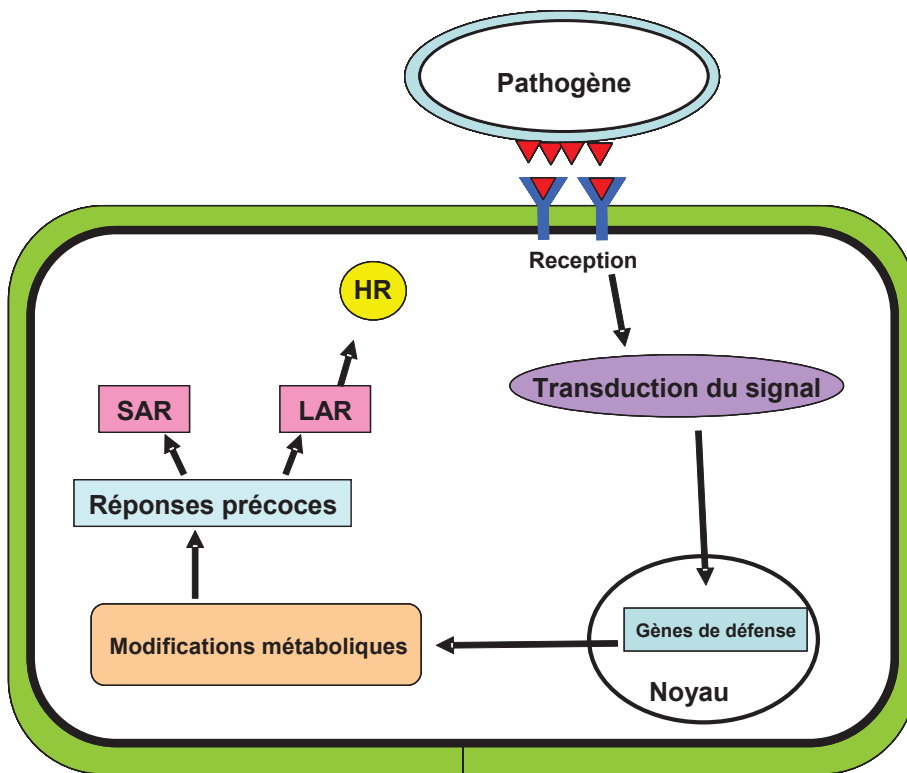


Figure 11 : Schéma de la mise en place des mécanismes de défense naturelle chez les plantes (d'après Pajot, 2005). **HR** : réaction hypersensible ; **SAR** : résistance systémique acquise ; **LAR** : résistance locale acquise.

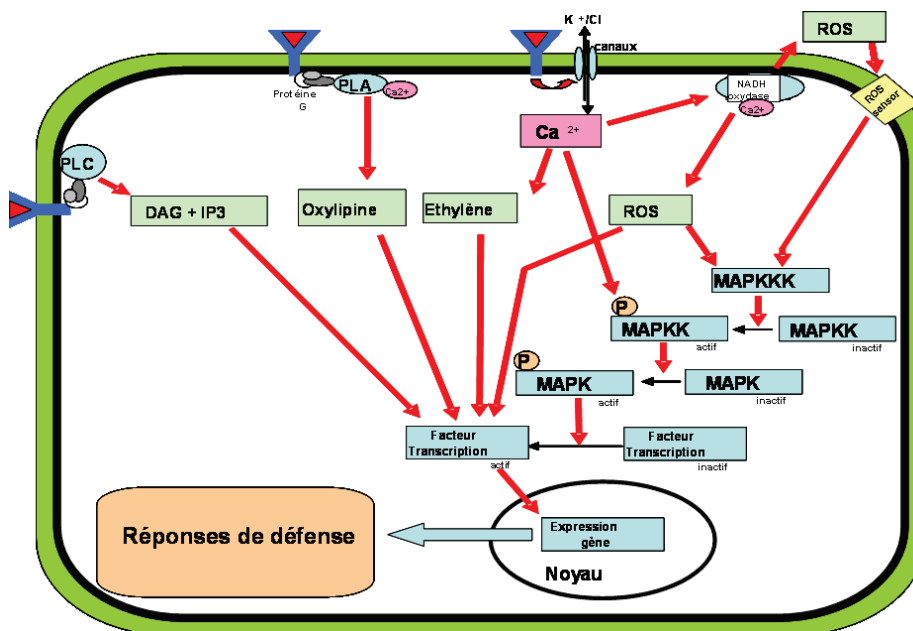


Figure 12 : Schéma de la transduction du signal après reconnaissance d'un éliciteur par un récepteur (d'après Zhao *et al.*, 2005). **DAG** : Diacyl glycérol ; **MAPK** : Mitogen-associated protein kinase ; **MAPKK** : MAPK kinase ; **MAPKKK** : MAPKK kinase ; **PLA** : Phospholipase A ; **PLC**, Phospholipase C ; **ROS**, espèces réactives de l'oxygène.

4.2.2. Les espèces réactives d'oxygène (ROS)

La réaction d'hypersensibilité provient d'un mécanisme complexe appelé « burst oxydatif », phénomène impliquant des réactions d'oxydo-réductions conduisant à :

- la synthèse de monoxyde d'azote (NO),
- de formes réactives de l'oxygène (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'anion superoxyde (O₂⁻), ainsi que le radical hydroxyle (OH[•]),
- mais également d'enzymes antioxydantes incluant des ascorbate-peroxydases, des glutathione-peroxydases, des catalases et des antioxydants non enzymatiques comme l'acide ascorbique, le glutathion et la riboflavine (Delledone *et al.*, 1998).

4.2.3. La voie de transduction des MAP Kinases

Des cascades de signalisation faisant intervenir des protéines kinases comme les mitogen-activated protein kinase (MAPK) sont activées rapidement en particulier en réponse à des interactions plante/pathogène (Figure 12, Zhang et Kesslig, 2001). La cascade de MAPK est une composante importante, située en aval des récepteurs et en amont des facteurs de transcription, dans la transduction des stimuli extracellulaires en réponses intracellulaires. La MAP kinase (MAPK) est activée par une MAPK kinase (MAPKK), qui, à son tour, est activée par une MAPKK kinase (MAPKKK).

L'activation ou l'inactivation de protéines ou d'enzymes essentielles au processus cellulaire est réalisée par phosphorylation ou déphosphorylation.

4.2.4. Les molécules "signal"

À l'issue des phénomènes précédemment décrits, certaines voies métaboliques secondaires sont stimulées et permettent la généralisation de la réponse dans la plante entière, au moment de la mise en place de la SAR (phytohormones) (Raynal *et al.*, 1980 ; Lyon, 2007).

La mise en place de la SAR nécessite le mouvement systémique d'un signal à partir des tissus infectés vers les tissus sains. Des molécules comme l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA), l'éthylène (ET), la systémine et même le peroxyde d'hydrogène participent à ces différentes voies de signalisation mises en œuvre en réponse à une élicitation. Ces molécules s'accumulent rapidement dans la cellule et permettent l'activation de l'expression des gènes de défense. Notre compréhension actuelle des rôles des voies de signalisation SA, JA et ET dans la défense des agents pathogènes ont été résumées dans plusieurs études (Dong, 1998 et Pieterse et Van Loon, 1999). Leur application de façon exogène peut également déclencher les mécanismes de la SAR. Elles peuvent donc jouer un rôle d'éliciteur.

La régulation des défenses par SA, JA/ET est complexe et à ce jour, les voies de signalisation semblent interagir entre-elles.

4.2.4.1. Défenses médiées par l'acide salicylique

L'acide salicylique est un composé phénolique obtenu par la voie de conversion de la phénylalanine en acide *trans* cinnamique par action enzymatique de la phénylalanine ammonia-

lyase (*PAL*) ou par la voie de l'isochorismate (Figure 13, Lee *et al.*, 1995 et Wildermuth *et al.*, 2001). Des études ont montré que les niveaux de SA augmentent dans les tissus de la plante en réponse à une infection pathogène, et que l'application exogène de SA induit une meilleure résistance à une large gamme de pathogènes (Ryals *et al.*, 1996). Des études génétiques ont également montré que l'acide salicylique est requis pour activer rapidement les réactions de défense influencées par plusieurs gènes de résistance, pour l'induction des défenses locales visant à contenir la croissance des pathogènes virulents, et pour l'établissement de la SAR (Ryals *et al.*, 1996). L'expression de plusieurs gènes liés à la pathogénèse (PR gènes) dépend de cette voie de l'acide salicylique et sont couramment utilisés comme marqueurs de défense des voies SA-dépendantes (PR1, PR2, PR3, PR4, PR5 et PR10). Grâce à la mutagenèse dirigée chez *Arabidopsis thaliana* (induction d'une ou plusieurs mutations dans le génome), il est possible dorénavant d'élucider les voies de signalisation mises en jeu en réponse à l'attaque de divers pathogènes (La Camera *et al.*, 2004).

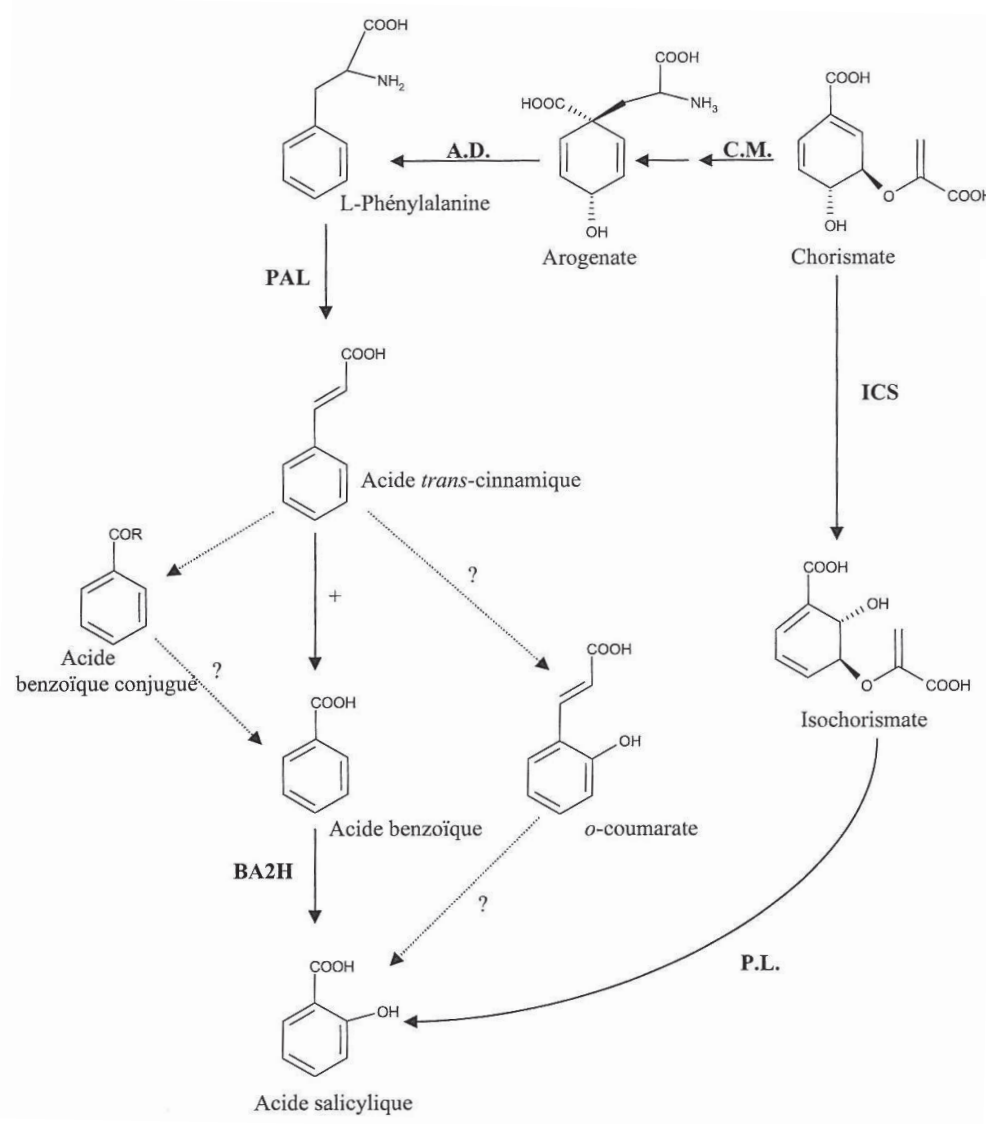


Figure 13 : Voie de biosynthèse de l'acide salicylique. **A.D.**, Arogonate déhydratase ; **BA2H**, acide benzoïque-2-hydroxylase ; **C.M.**, Chorismate Mutase ; **ICS**, Isochorismates synthase ; **PAL**, Phénylalanine ammonia-lyase ; **P.L.**, Pyruvate lyase (d'après Lee *et al.*, 1995 et Wildermuth *et al.*, 2001).

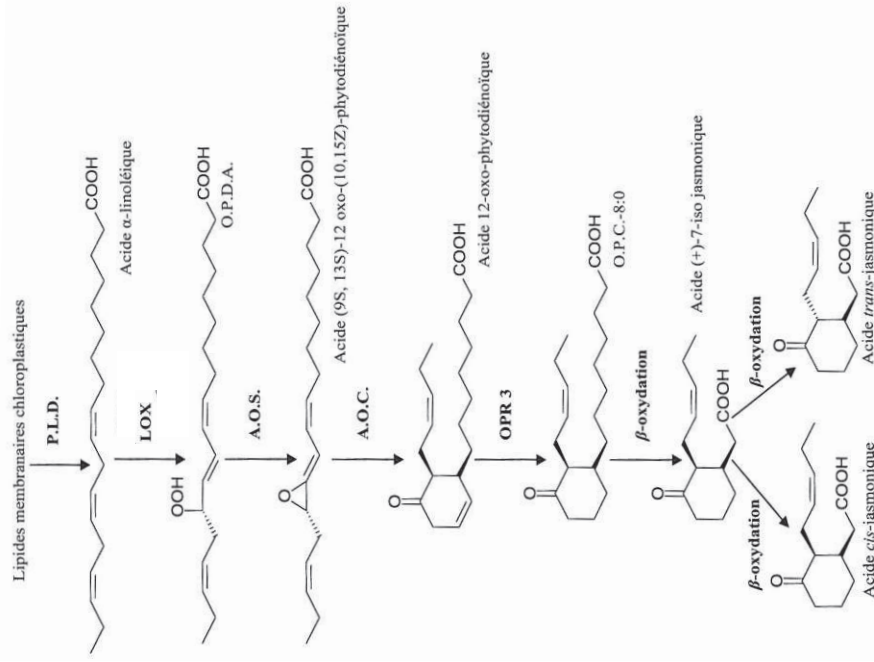


Figure 14: Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique. **A.O.C.** : Allène Oxyde Cyclase ; **A.O.S.** : Allène Oxyde Synthase ; **LOX** : Lipoxygénase ; **O.P.C.-8:0** : acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentylo)-cyclopentane-1 octanoïde ; **O.P.D.A.** : acide 13-(S) hydroperoxy-octadecatriénoïque ; **OPR 3** : O.P.D.A réductase ; **P.L.D.** : Phospholipase D (d'après Turner, *et al.*, 2002).

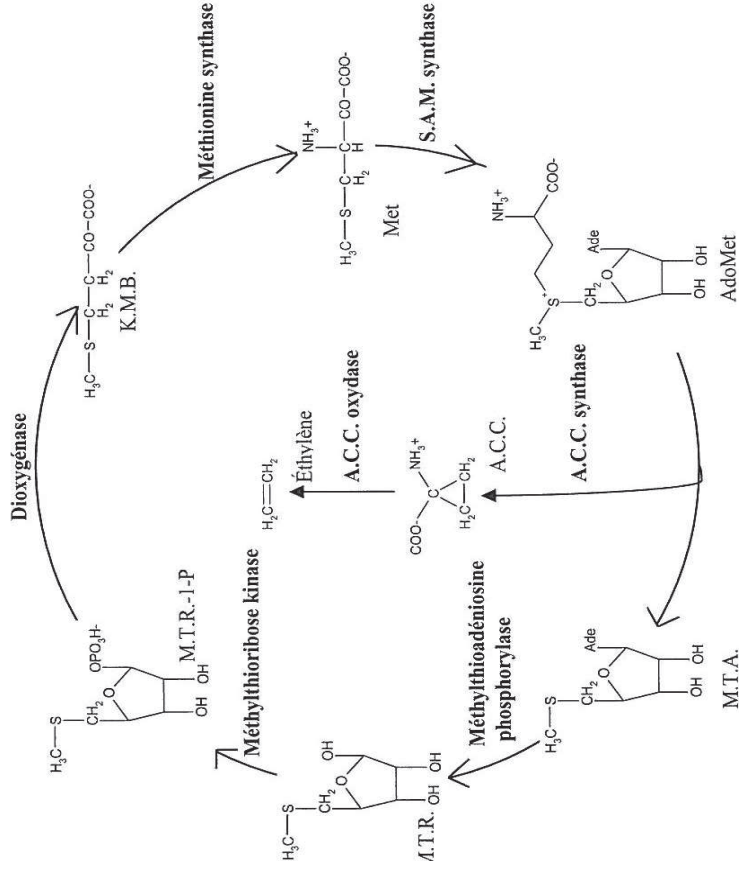


Figure 15: Voie de biosynthèse de l'éthylène. **A.C.C.** : Acide amino Cyclopropane Carboxylique ; **Adé** : Adénine ; **AdoMet** : S-adenosyl-L-Méthionine ; **K.M.B.** : acide 2-keto-4-méthylthiobutyrique ; **Met** : Méthionine ; **M.T.A.** : 5'-méthylthioadénosine ; **M.T.R.** : 5'-méthylthioribose ; **M.T.R.-1-P** : 5'-méthylthioribose-1-phosphate (d'après Bleecker et Kende, 2000).

4.2.4.2. Défenses médiées par l'acide jasmonique et l'éthylène

Les jasmonates dérivent de l'acide linoléique et appartiennent à la famille des oxylipines (Figure 14, Turner, *et al.*, 2002). L'éthylène est une hormone végétale dérivée de la méthionine *via* l'acide 1-aminocyclopropane-1 carboxylique (ACC) par action enzymatique de l'ACC synthase (Figure 15, Bleecker et Kende, 2000).

Les mutants *Arabidopsis thaliana* déficients en production de JA (les triple-mutants fatty acid desaturase 3/7 et 8-*fad3/fad7/fad8*), insensibles à l'application de JA (coronatine insensitive 1-*coi1* et jasmonic acid resistant 1-*jar1*) ou les mutants insensibles à l'application d'éthylène (ethylene insensitive 2-*ein2*) présentent une sensibilité accrue à de nombreux pathogènes (Vijayan *et al.*, 1998 et Thomma *et al.*, 1999, Figures 16 et 17).

Plusieurs gènes JA et ET- dépendant, codant pour des PR protéines (Plant defensin 1.2-*PDF1.2*, Thionin 2.1-*THI2.1*, Hevein like protein- *HEL*, et Chitinase-*PR3* et *PR8*) sont couramment utilisés comme marqueurs de réponses de défenses médiées par l'acide jasmonique et l'éthylène (Kunkel et Brooks, 2002).

4.2.4.3. Interactions entre les voies de signalisation SA-JA/ET ("Cross-talk")

Les interactions en les voies de signalisation de SA et JA/ET semblent complexes et peuvent être à la fois positives et négatives (Figures 16 et 17).

Des mutants d'*Arabidopsis thaliana* (enhanced disease susceptibility1-*eds1*, *eds4*, *eds5*, phytoalexin deficient4-*pad4* et SA induction deficient2-*sid2*) et des lignées de plants transgéniques *NahG* exprimant le gène d'une enzyme qui dégrade le SA (gène codant pour une salicylate hydroxylase) présentent des sensibilités accrues aux pathogènes (Glazebrook *et al.*, 1996) (Figures 16 et 17). De même, les plantes qui portent des mutations dans le gène *NPR1* (Non- Expressor of PR1), codant pour un élément de signalisation en aval de SA, présentent également une sensibilité accrue à ces agents pathogènes.

Les mutants *eds4* et *pad4*, déficients pour l'accumulation de SA montrent des réponses accrues d'accumulation de gènes JA-dépendant (Li *et al.*, 2004) et inversement des mutants déficients dans l'accumulation de JA (*coi1*) présentent une induction de l'expression des défenses SA-dépendant et induit la résistance à *Pseudomonas. Syringae* (Kloek *et al.*, 2001).

Des études ont également montré que la voie de signalisation de l'éthylène affecte aussi négativement les réponses SA dépendantes: le niveau basal d'ARNm de *PR1* apparaît être significativement élevé dans les mutants *ein2* (Lawton *et al.*, 1994).

Récemment, des études indiquent que la signalisation des défenses semble complexe, et que des voies de signalisation supplémentaires sont susceptibles d'être impliquées dans la régulation de la défense des plantes. Par exemple, l'induction de gènes de défense de la tomate *Pti4* et *Pti5* (qui codent pour des facteurs de transcription) en réponse à l'infection par *P. syringae* est indépendant des voies de SA, JA et ET (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011 ; Thara *et al.*, 1999). De plus, chez *A. thaliana*, la caractérisation de mutants *dth9* qui présentent à la fois une insensibilité à l'auxine et une sensibilité accrue à *P. parasitica* et *P. syringae*, suggère qu'au moins certaines composantes de la signalisation de l'auxine pourrait jouer un rôle dans les réponses de défense aux agents pathogènes (Mayda *et al.*, 2000).

Il est plausible que l'ensemble des phytohormones puissent intervenir dans ce dialogue moléculaire de défenses des plantes.

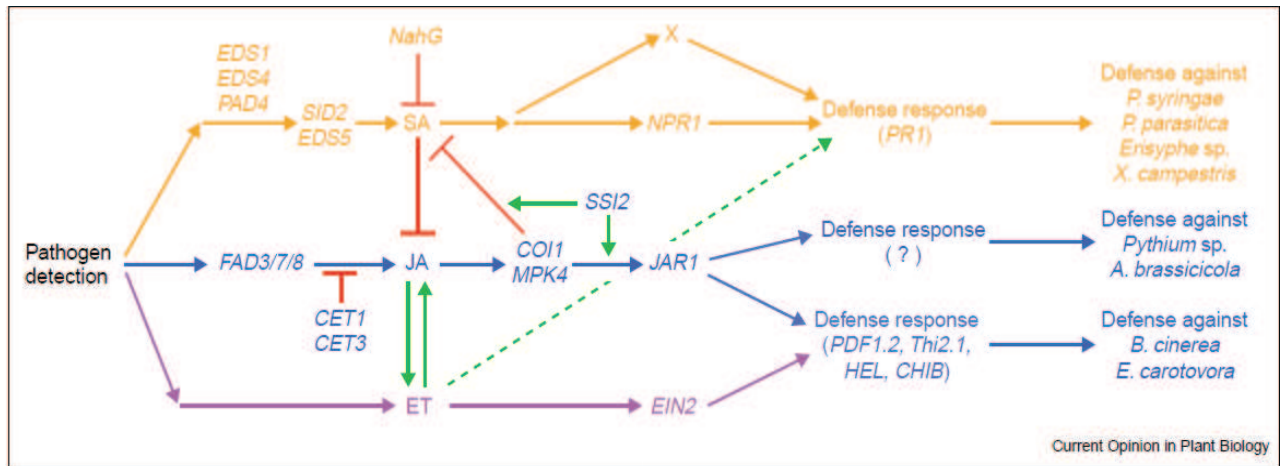


Figure 16 : Modèle des voies de signalisation du SA, JA et ET dans les défenses d'*Arabidopsis thaliana* contre les agents pathogènes (Kunkel et Brooks, 2002).

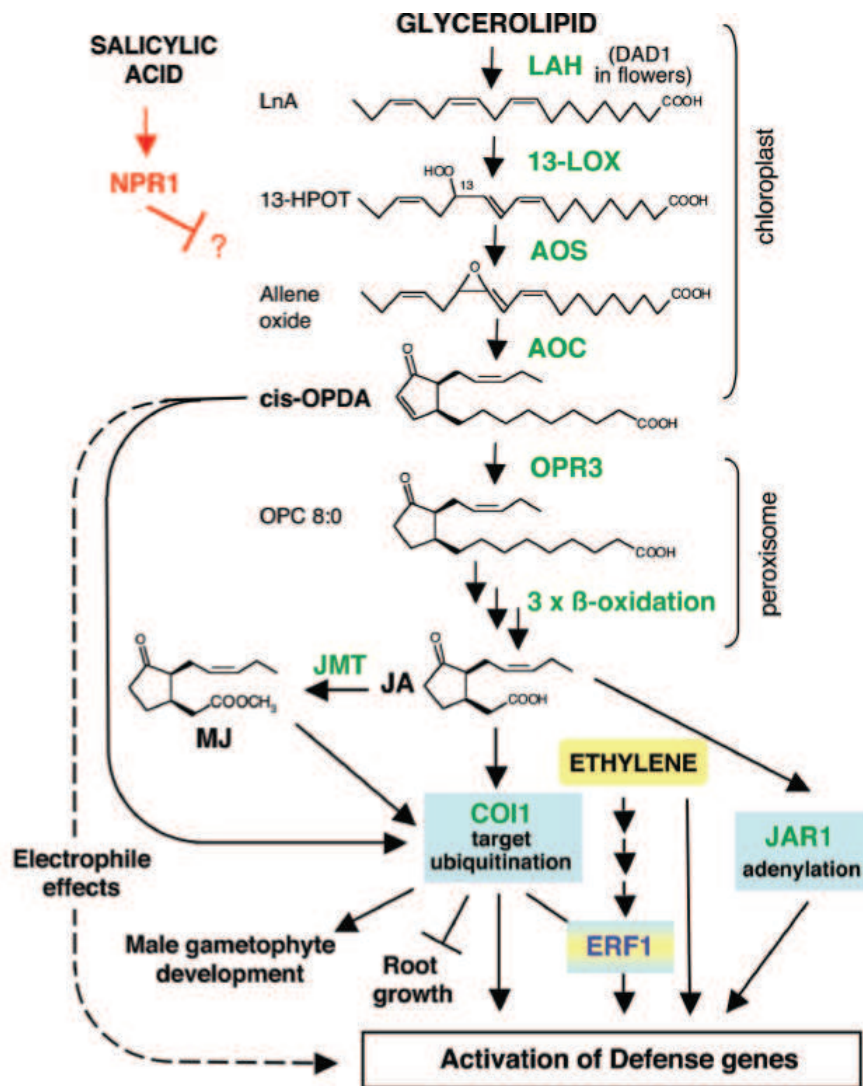


Figure 17 : Voie de biosynthèse et de signalisation chez *Arabidopsis thaliana* (d'après La Camera *et al.*, 2004).

4.3. Réactions de défense de la plante

Les modifications métaboliques cellulaires et moléculaires impliquées dans la lutte contre une infection mises en place par l'ensemble des végétaux induisent systématiquement trois catégories de réactions :

4.3.1. Le renforcement des parois végétales

Le renforcement des parois pecto-cellulosiques des cellules végétales constitue un élément important des défenses des plantes. L'accumulation de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP dont les extensines, Cheong *et al.*, 2002), de protéines riches en glycine (GRP) ou riches en proline (PRP), et des dépôts de callose (polymère de D-glucose, Hui *et al.*, 2003) interviennent dans ces processus de défense mécanique. Des dépôts de lignine peuvent également s'effectuer au niveau des plasmodesmes bloquant ainsi la progression des virus et permettent la lignification des papilles en protégeant la plante d'une infection ultérieure (Robatzek et Somssich, 2002 ; Li *et al.*, 2004).

4.3.2. La production de métabolites secondaires

Certaines voies métaboliques secondaires sont stimulées et induisent la synthèse de composés qui, d'une part, inhiberont ou bloqueront le pathogène au site d'infection (*e.g.* les phytoalexines) (Raynal *et al.*, 1980 ; Lyon, G., 2007).

Les phytoalexines sont des molécules de faible poids moléculaire et à fort potentiel antibiotique, antifongique et peuvent être issus de la voie de l'acétyl-CoA, de l'isopentenyle diphosphate (IPP), des sesquiterpènes, des shikimates (Coumarines), ou des phénylpropanoïdes (stilbènes et flavonoïdes) (Hammerschmidt, 1999).

Le métabolisme des phénylpropanoïdes conduit, à partir de la phénylalanine (Phe), à la synthèse d'une multitude de composés dont la nature peut varier suivant les espèces végétales. L'ensemble des composés phénylpropanoïdes dérive de l'acide *trans*-cinnamique, le premier phénylpropane formé à partir de la Phe grâce à l'action de la Phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL). La PAL est l'enzyme constituant le point de branchement entre le métabolisme primaire du shikimate, qui conduit aux acides aminés aromatiques, et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes (Figure 18). Un grand nombre de phénylpropanoïdes sont des dérivés dont la synthèse débute par la condensation du *p*-coumaroyl-CoA et de trois molécules de malonyl-CoA. Cette réaction est catalysée par la chalcone synthase (CHS). Le produit de cette réaction va conduire à toute une panoplie de molécules aux propriétés antioxydantes (les flavonoïdes), anti-microbiennes (les isoflavonoïdes) et toxiques pour les herbivores (les tannins condensés (Figure 18). Certaines espèces végétales codent également pour une stilbène synthase (STS) qui utilise les mêmes substrats que la CHS et conduit à la synthèse des stilbènes, des composés aux propriétés anti-oxydantes ou anti-microbiennes tels que le resvératrol (Figure 19). La Stilbène Synthase (STS) est codée par une famille multigénique comprenant 43 gènes différents chez la vigne (Jaillon *et al.*, 2007). La STS est directement reliée à la Chalcone Synthase (CHS), la première enzyme clé de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Figure 20) puisqu'elle présente 70 à 75 % d'homologie de séquence protéique. Les séquences diffèrent seulement de 35 acides aminés (Schröder, 1999).

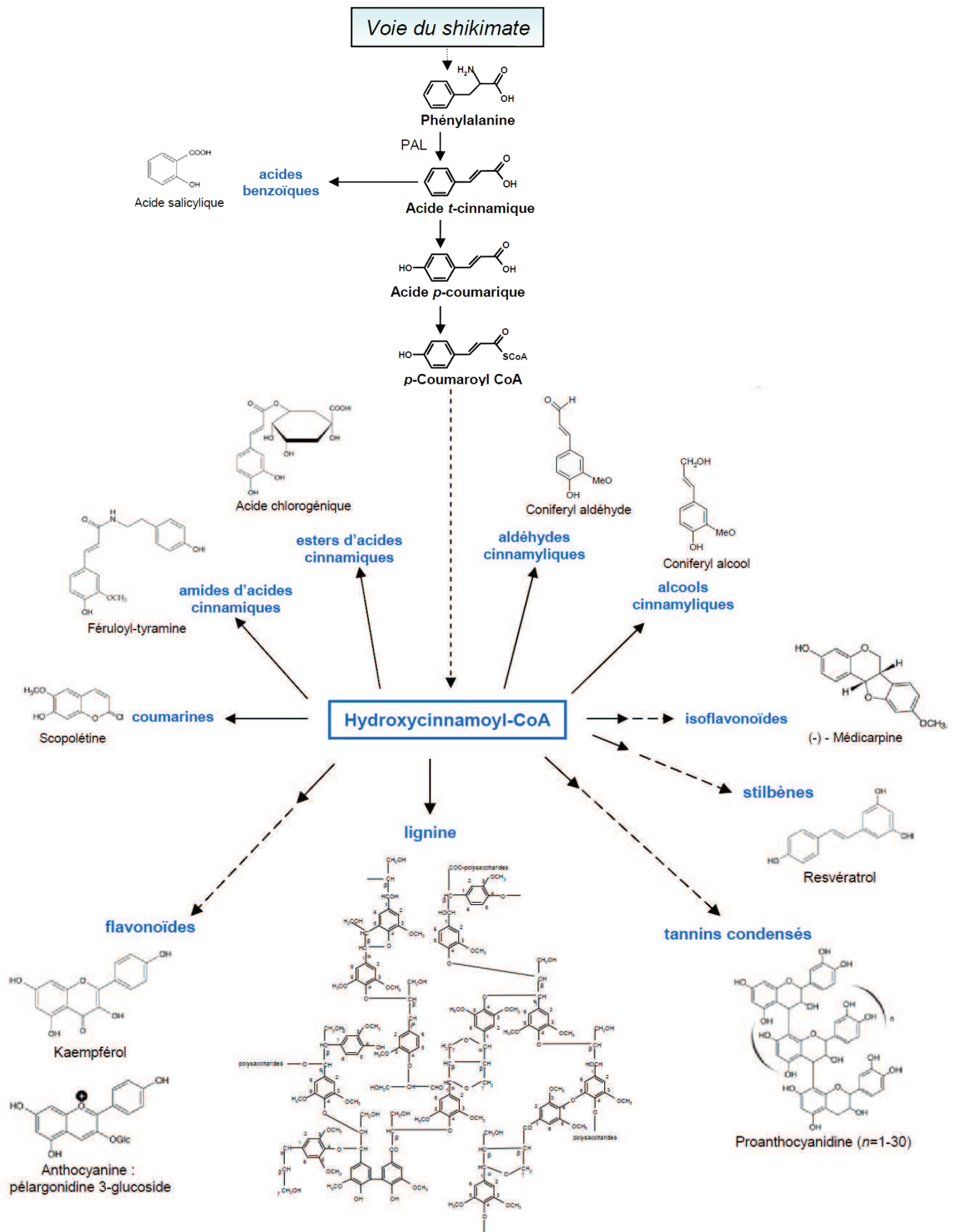


Figure 18 : Quelques exemples de composés dérivant du métabolisme des phénylpropanoïdes. PAL, phénylalanine ammoniac lyase (d'après Hoffmann, 2003).

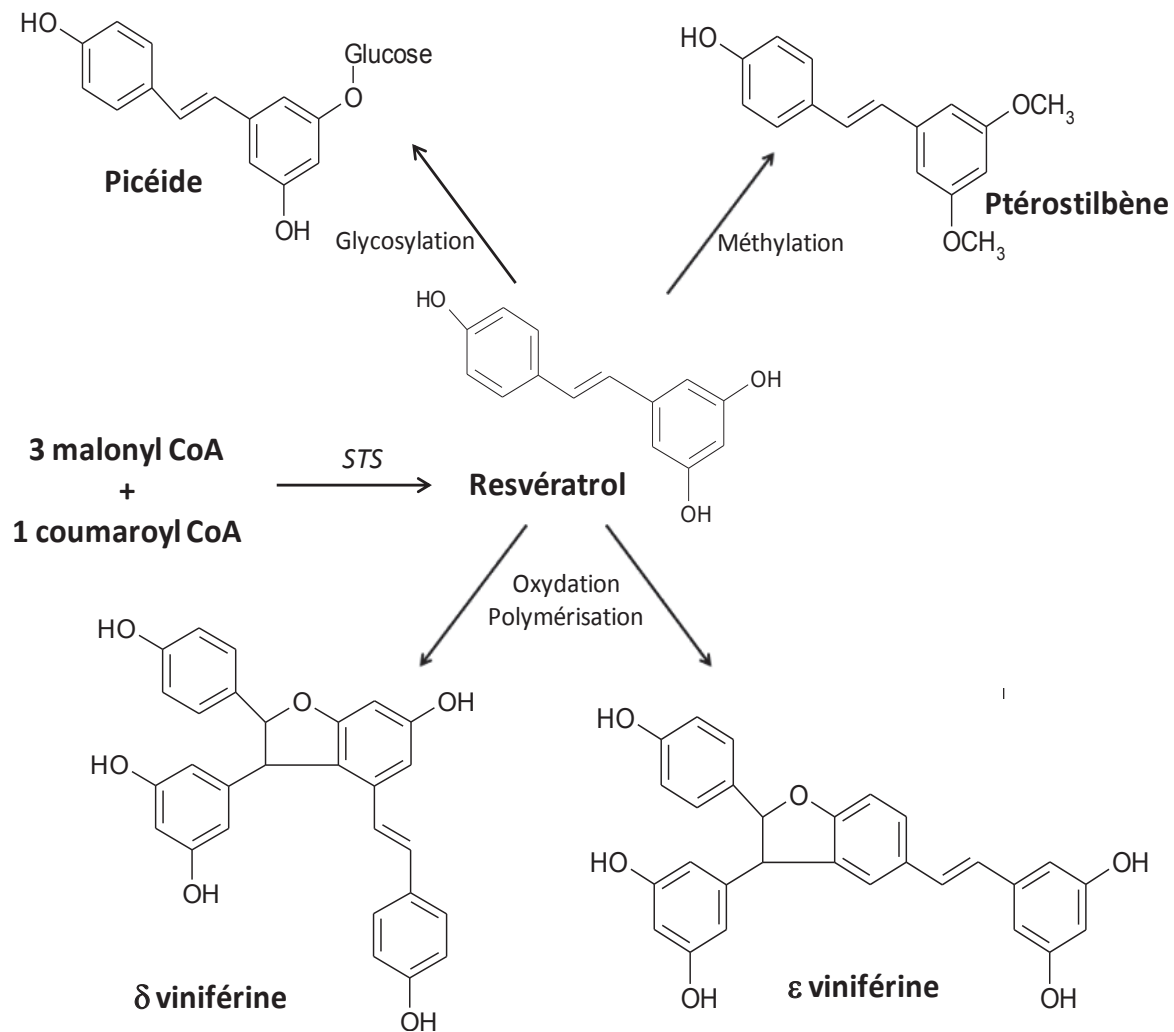


Figure 19 : Voie de biosynthèse des stilbènes. STS : Stilbène Synthase.

Malgré une expression de la STS constitutive, elle est également induite en réponse à des stress biotiques ou abiotiques (Wiese *et al.*, 1994). Les phytoalexines possèdent donc une activité biologique contre une grande variété de pathogènes et peuvent être considérées comme des marqueurs de résistances de la plante (Dercks et Creasy, 1989).

Les phytoalexines de vigne semblent constituer un groupe plutôt restreint de molécules appartenant à la famille des stilbènes (Langcake et Pryce, 1977) basée sur la structure du *trans*-resvératrol (Figure 18). D'autres composés, oligomères du resvératrol, ont été trouvés chez la vigne en réponse à un stress ou à une infection (les viniférines). Le composé majoritaire est l' ϵ -viniférine, un déhydrodimère du resvératrol (Langcake et Pryce, 1977 ; Jeandet *et al.*, 1997 et Pezet *et al.*, 2004). Néanmoins, l' α -viniférine et la δ -viniférine peuvent également être détectées (Pryce et Langcake, 1977).

Des composés simples ont également été identifiés : le *trans*-ptérostilbène, un dérivé diméthylé du resvératrol (3,5 diméthoxy-4'hydroxystilbène, Figure 19) (Langcake, 1981 et Pezet *et al.*, 2003) ; le *cis* et *trans* picéide et le *cis* et *trans*-astringine, des 3-O- β D glucosides

de resvératrol ou le *cis* et *trans*-resvératrol, un 4'-O- β D glucoside (de Lima *et al.*, 1998). Les stilbènes sont facilement repérables *in vivo* et sont responsables d'une fluorescence bleue observée à la surface des feuilles ou des baies après exposition aux UV qui induisent leur accumulation.

Le fait que les stilbènes aient une activité antifongique substantielle suggère que ces composés interviendraient dans la résistance et pourraient être utilisés comme des indicateurs de résistances. Ainsi, des concentrations plus importantes de viniférines sont-elles observées 48 heures après inoculation de *P. viticola*, alors que la teneur en resvératrol se maintient permettant la biosynthèse de viniférine (Pezet *et al.*, 2004). Dans les cultivars sensibles, le resvératrol est synthétisé en grande quantité mais il est rapidement glycosylé en picéide, composé moins toxique et ses concentrations sont trop faibles pour protéger la plante. Dans les cultivars résistants à *P. viticola*, le resvératrol est également synthétisé en grande quantité, mais il est rapidement oxydé et transformé en ϵ - et δ - viniférines par des peroxydases spécifiques. Le ptérostilbène et la δ - viniférine sont 5 fois plus toxiques que le resvératrol ou l' ϵ - viniférine (Pezet *et al.*, 2004 et Adrian *et al.*, 1997). Schnee *et al.* (2008) montre également que les viniférines constituent un marqueur fiable de résistance à l'oïdium pour évaluer le potentiel de défense des cultivars de vigne dans un programme d'amélioration variétale. Le ptérostilbène et la δ -viniférine semblent être de bons marqueurs de résistance de la vigne.

Parmi les isoflavonoïdes issus de la condensation du *p*-coumaroyl-CoA et de trois molécules de malonyl-CoA catalysée par la Chalcone Synthase (CHS), les proanthocyanidines (PA, Figure 20 et 21), aussi connus comme tanins condensés, représentent l'un des groupes les plus importants de métabolites secondaires après les phénylpropanoïdes et la lignine. Les PAs possèdent une gamme d'effets biologiques qui inclue une activité antifongique contre *Botrytis cinerea* (Iriti *et al.*, 2005). Les groupes majoritaires de PA sont les procyanidines (catéchines et cyanidines) et les prodelfinidines (gallocatéchines et delphinidines) (Figure 21). Les isoflavonoïdes peuvent également jouer un rôle dans la protection des jeunes baies ou des feuilles contre des attaques d'agents phytopathogènes tels que *P. viticola* (Dai *et al.*, 1995).

Une expression induite des gènes CHS, STS et CHI après inoculation de *P. viticola* indique une activation des réponses de défense. Les catéchines affectent négativement la croissance mycélienne et la sporulation dans les défenses contre *P. viticola* (Dai *et al.*, 1995; Kortekamp et Zyprian, 2003).

L'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes (CHS, CHI, DFR, F3H, LDOX, LAR) est renforcée dans le cultivar sensible Riesling après inoculation avec *Pseudoperonospora cubensis* et *P. viticola* et leurs produits semblent également s'accumuler dans les tissus. Dans le cultivar résistant Gloire, les gènes ne sont pas exprimés après infection en raison de la forte teneur en composés flavonoïdes dans les feuilles de ce cultivar. Toutefois, l'activation rapide de l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse et la production de ces composés peuvent indiquer une résistance accrue ou induite (Kortekamp, 2006).

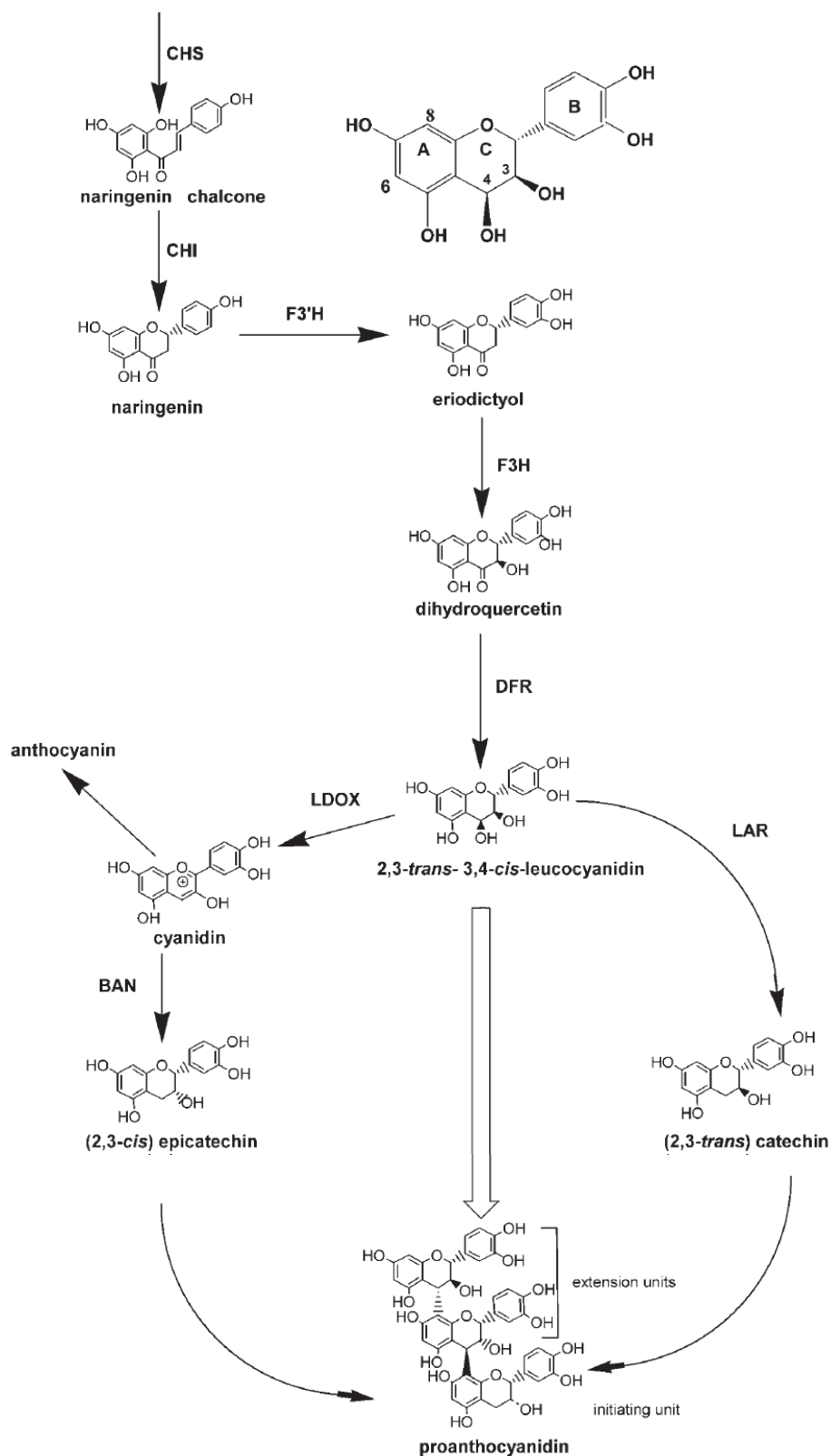
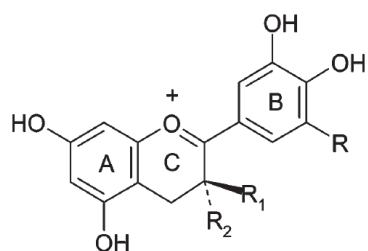


Figure 20 : Voie de biosynthèse des procyanidines et prodelphinidines (d'après Tanner *et al.*, 2003). **CHS**, Chalcone Synthase ; **CHI**, Chalcone Isomérase, **F3H**, Flavonone 3 β -hydroxylase ; **F3'H**, Flavonone 3 β hydroxylase; **DFR**, dihydroflavanol reductase; **LAR**, Leucoanthocyanidine reductase, **LDOX**, Leucoanthocyanidine dioxygénase.



R=H, R ₁ =OH, R ₂ =H	(+)-Catechin
R=OH, R ₁ =OH, R ₂ =H	(+)-Gallocatechin
R=H, R ₁ =H, R ₂ =OH	(-)-Epicatechin
R=OH, R ₁ =H, R ₂ =OH	(-)-Epigallocatechin
R=H, R ₁ =H, R ₂ =O-galloyl	(-)-Epicatechin-3-O-gallate

Figure 21 : Formules chimiques des proanthocyanidines (d'après Iriti *et al.*, 2005).

Tableau 7 : Familles de PR protéines connues (d'après Van Loon *et al.*, 2006).

Famille	Propriétés	Membre type
PR-1	Inconnue	PR-1a du tabac
PR-2	β -1,3 glucanase	PR-2 du tabac
PR-3	Chitinase de type I, II, IV, V, VI, VII	P et Q du tabac
PR-4	Chitinase de type I et II	R' du tabac
PR-5	Thaumatine like protéine	S du tabac
PR-6	Inhibiteur de protéase	Inhibiteur I de la tomate
PR-7	endoprotéinase	P ₆₉ de la tomate
PR-8	Chitinase de type III	Chitinase du concombre
PR-9	Peroxydase	"lignin-forming peroxidase" du tabac
PR-10	Ribonucléase	"PR1" du persil
PR-11	Chitinase de type I	Chitinase de classe V du tabac
PR-12	Défensine	Rs-AFP3 du radis
PR-13	Thionine	THI2.1 d'Arabidopsis
PR-14	Protéine de transfert des lipides	LTP4 de l'orge
PR-15	Oxalate oxydase	OxOa (germin) de l'orge
PR-16	Oxalate oxydase like	OxOLP de l'orge
PR-17	inconnue	PRp27 du tabac

4.3.3. La synthèse de protéines de défense

Les PR protéines (Pathogenesis-Related Protein : protéines liées à la pathogénèse) ont été décrites dans de nombreuses espèces de plantes en réponse à une infection. Ces protéines sont principalement absentes dans la plante saine et possèdent des activités antimicrobiennes, voire toxiques de par leurs propriétés hydrolytiques sur la paroi cellulaire des agents pathogènes (les chitinases ou les β -1,3 glucanases) (Giannakis *et al.*, 1998). D'après la classification de Van Loon et Van Strien de 1999, on compte aujourd'hui jusqu'à 17 familles de protéines PR (Van Loon *et al.*, 2006, Tableau 7).

Les PR protéines ont dans un premier temps été décrites dans des feuilles de plants de tabac suite à une infection par le virus de la mosaïque du tabac (Gianinazzi *et al.*, 1970). Les membres d'au moins quatre de ces familles, y compris les β -1,3-glucanases (PR-2), les chitinases (PR-3 et PR-4) et thaumatine-like protéines (PR -5), présentent des activités antifongiques *in vitro*, qui soutiennent un rôle possible de ces protéines dans la défense des plantes. Des études ont également démontré que les plantes transgéniques exprimant ces gènes de PR protéines montrent une résistance accrue aux pathogènes fongiques (Zhu *et al.*, 1994). Renault *et al.* (1996) a détecté une induction de PR protéines, dont une chitinase et plusieurs β -1,3-glucanases, dans des feuilles de vigne, après application d'acide salicylique ou une infection par *Botrytis cinerea*. Busam *et al.* (1997) ont rapporté une expression différentielle des deux gènes de chitinases de vigne en réponse à des activateurs de la SAR et une infection avec *P. viticola*. Plus récemment, Giannakis *et al.* (1998) décrivent une corrélation entre les activités combinées d'une chitinase et d'une β -1,3-glucanase de plusieurs cultivars de vigne et la résistance observée au champ face à l'oïdium. Par ailleurs, ils ont pu démontrer que les protéines purifiées à partir des feuilles d'un cultivar résistant inhibent *in vitro* la croissance de l'oïdium. De plus, les niveaux d'activités de deux chitinases et d'une β -1,3-glucanase augmentent sensiblement dans les feuilles et les baies de cultivars de vigne sensibles infectés par l'oïdium associés à l'expression des gènes de défense correspondant (PR-2, PR-3 et PR-5) (Jacobs *et al.*, 1999).

5. Amélioration de la protection de la vigne contre des pathogènes biotrophes

5.1 Amélioration variétale

L'amélioration variétale de la vigne combine la résistance acquise d'espèces de *Vitis* américaines, avec la qualité de production de raisins de cuve. Cette stratégie est devenue importante pour combattre les maladies cryptogamiques de la vigne. Malgré les inconvénients de l'amélioration variétale de la vigne, au fil du temps cette stratégie a conduit à la fin du 20^{ème} siècle au développement de variétés résistantes qui peuvent être cultivées sous faible pression fongicide. Ainsi à titre d'exemple, Georges Coudrec et Albert Siebel réalisent des hybridations entre des espèces américaines (*Vitis riparia*, *V. rupestris*, *V. labrusca*, *V. berlandieri* et *V. aestivalis*) et européennes (*Vitis vinifera*), pour allier la robustesse des cépages américains et la qualité *Vitis* européens. Une quantité inimaginable d'hybrides producteurs directs, numérotés au fur et à mesure de leur obtention, va être ainsi créée (Galet, 1988). Cependant, la qualité des fruits n'était pas satisfaisante, principalement en raison de l'hérédité quantitative de la résistance et des caractères de qualité (Eibach *et al.*, 1989). L'utilisation de ces hybrides a donc été limitée jusqu'à ce que leur culture soit finalement interdite en Europe (Galet, 1988).

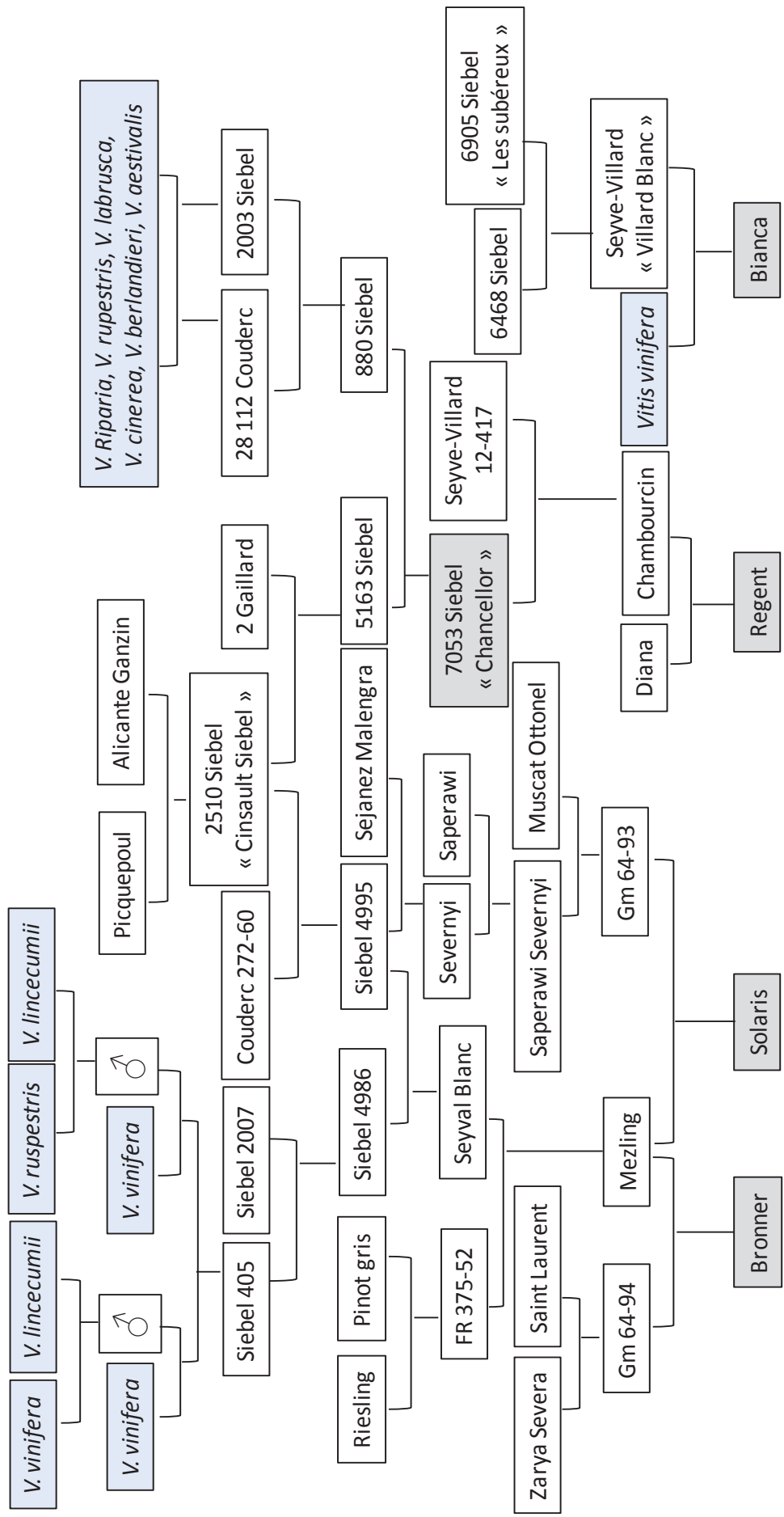


Figure 22 : Généalogie des variétés résistantes commercialisées.

Cependant, des variétés sont actuellement commercialisées et développées comme Villard Blanc ou Noir, Chambourcin, Plantet, Bronner, Regent, Solaris, Merzling, Seyval Blanc, *etc...*, lesquelles combinent ainsi qualité du vin et résistance à *E. necator* et *P. viticola* (Figure 22) (Gindro *et al.*, 2007).

La génétique, basée sur l'analyse des populations ségrégantes, permet de dresser la carte des *loci* liés à des traits spécifiques (QTLs). L'analyse de variants somatiques est une autre façon de développer l'aspect génétique, mais il n'existe pas à ce jour de collections de mutants artificiels de *Vitis* disponibles. Le séquençage complet du génome de *Vitis vinifera* L. est récent (Jaillon *et al.*, 2007) et sa comparaison avec d'autres génomes d'angiosperme (*Arabidopsis*, le riz, le peuplier et la papaye) a révélé qu'une grande proportion des gènes dans chaque espèce est originale.

Cependant, pour étudier la liaison entre des gènes et des caractères, des études basées sur la perte ou le gain de fonctions homologues sont exigées. Pour ce faire, des facteurs génétiques impliqués dans la variation des caractères quantitatifs (QTLs) ont été localisés, sur la base d'une carte moléculaire et génétique couverte avec une bonne saturation et répartition de marqueurs (Fischer *et al.*, 2004 et Pauquet *et al.*, 2001). Plus un marqueur est proche d'un gène d'intérêt, plus la probabilité de recombinaison entre le marqueur et le gène au cours de la méiose est faible : suivre le marqueur est équivalent à suivre le gène impliqué dans le caractère étudié. Ainsi, la cartographie génétique de la vigne est-elle maintenant une étape importante pour les stratégies d'amélioration.

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Un bon marqueur doit être à hérédité simple, multi-allélique et co-dominant. Différentes catégories de marqueurs peuvent être utilisés: les marqueurs de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et les marqueurs basés sur la méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction). Les marqueurs de type PCR les plus largement utilisés sont les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat), l'AFLP, (Amplified Fragment Length Polymorphism) et la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Une fois la corrélation entre un marqueur moléculaire et un phénotype spécifique établie, l'hérédité d'un trait d'intérêt peut être marqué dans une descendance à des stades très précoces du développement des plantes (sélection assistée par marqueurs : SAM) (Fischer *et al.*, 2004). Avec cette approche, des gènes candidats sont identifiés et ainsi disponibles pour l'amélioration des cultivars de vigne après une caractérisation fonctionnelle.

Des études décrivent la cartographie de la résistance à l'oïdium sur les chromosomes 12, 13, 14 et 18 et la résistance au mildiou sur les chromosomes 7, 8, 9, 10, 12 et 17 chez *V. riparia* ; 4 et 18 dans Regent ; 14 dans *V. amurensis* et 12 et 18 chez *M. rotundifolia* (Tableau 8).

En 1974, l'INRA a entrepris la sélection de variétés résistantes en introgressant chez *Vitis vinifera* des gènes issus de l'espèce *Muscadinia rotundifolia* (Figure 23) (Merdinoglu *et al.*, 2003). La muscadine (*M. rotundifolia* Michx.), originaire du Sud-Est des Etats-Unis, est très résistante à la plupart des agents pathogènes inféodés à *V. vinifera* (Bouquet, 1986), y compris *E. necator* et *P. viticola*. L'espèce a été classée par Planchon (1887) dans le genre *Vitis*, mais en raison de ses caractéristiques anatomiques et morphologiques, la Muscadine est classée comme un genre distinct. De plus, le nombre de chromosomes est différent dans *Vitis* ($2n = 38$) et *Muscadinia* ($2n = 40$). Les programmes visant à l'introgression de gènes de résistance de *M. rotundifolia* dans *V. vinifera* sont limités par la stérilité des hybrides obtenus (Bouquet, 1986).

Tableau 8 : QTLs associés à la résistance contre *P. viticola* et *E. necator*

	Auteurs	QTL	Sources de résistance	Groupe de Liaison	Marqueurs	Types marqueurs	
<i>Plasmopara viticola</i>	Merdinoglu, D. <i>et al</i> , 2003	Rpv1	<i>Muscadinia rotundifolia</i>	12	VMC4f3,1 VMC8g9	SSR	
	Weidemann-Merdinoglu, S. <i>et al</i> , 2004	Rpv2	<i>Muscadinia rotundifolia</i>	18	VMC6f11 VVMD17	SSR	
	Bellin, D. <i>et al</i> , 2009	Rpv3	"Bianca"	18	UDV305 VMC7f2	SSR	
	Blasi, P. <i>et al</i> , 2011	Rpv8	<i>Vitis amurensis</i>	14	VMC8h10a VVIp22	SSR	
	Fisher, B.M. <i>et al</i> , 2004			"Regent"	9	RA14500 RL14100	RAPD SCAR
					10	VVMD27 Aller680	CAPS SSR
	Marguerit, E. <i>et al</i> , 2009			<i>Vitis riparia</i> "Gloire Montpellier"	9	VVIO52b	SSR
					12	VMC8g9	
	Marino, <i>et al</i> , 2003			<i>Vitis riparia</i>	1	?	SSR
					18	?	AFLP
	Welter, L.J <i>et al</i> , 2007			"Regent"	18	rgVrip064 rgVamu137	RGA
					4	VC7h3 VMCNg2e1	SSR
Akkurt, M. <i>et al</i> , 2007			"Regent"	18	A14500 M21300 UDV112	SSR	
<i>Erysiphe necator</i>	Fisher, B.M. <i>et al</i> , 2004		"Regent"	16	R9173 RLN3900	RAPD SCAR CAPS SSR	
	Zyprian, E. <i>et al</i> , 2003		"Villard Blanc"	18	rgVamu137	RGA	
	Pauquet, J. <i>et al</i> , 2001 Bouquet, A. <i>et al</i> , 1986	Run1		<i>Muscadinia rotundifolia</i>	12	EMab12 EMeb2	AFLP
	Coleman, C. <i>et al</i> , 2010	REN1		<i>Kishmish vatkana</i>	13	VMC9h4-2 VMCNg4e10-1 UDV020	SSR
Riaz, S. <i>et al</i> , 2011	Run2.1 Run2.2 REN4		<i>Muscadinia rotundifolia</i> "Trayshed"	18	UDV108	SSR	
					<i>Muscadinia rotundifolia</i> "Magnolia"		VMC7f2
			<i>Vitis romaneï</i>	18	VMC8g9 VMC4f3-1		
<i>Xylella fastidiosa</i>	Dalbó, M.A. <i>et al</i> , 2001		<i>Vitis cinerea</i> x <i>Vitis rupestris</i>	14	STS AA6	SSR	
	Kriranek, A.F. <i>et al</i> , 2006	PdR1	<i>V. arizonica</i> , <i>V. rupestris</i> <i>V. candicans</i>	14	VMC6e1 VMC5b3	SSR	
<i>Xiphinema</i>	Walker, M.A., 2006		<i>V. arizonica</i>	19		RGA	
<i>Meloidogyne</i> spp	Lowe, K.M. et Walker, M.A., 2006		<i>V. champinii</i> x <i>V. riparia</i>	18	VMC6f11 VMC6f5 VMCNg3h8 VMCNg1b2.2	SSR	

Une résistance totale à l'oïdium provenant *M. rotundifolia* a été trouvée, contrôlée par un seul locus dominant (Bouquet, 1986) dénommé Run1 (pour **R**ésistance to *U*ncinula *n*ecator 1), introduit par six croisements successifs complexes (en utilisant une stratégie de pseudo-rétrocroisement, différents génotypes *Vitis vinifera* sont utilisés à chaque étape de rétrocroisement pour éviter la consanguinité) (Bouquet *et al.*, 1986).

Plus récemment, l'analyse génétique de populations ségrégantes sur le phénotype de résistance au mildiou a permis d'identifier deux QTL de résistance majeur, *Rpv1* et *Rpv2* (pour **R**ésistance *P*lasmodia *v*iticola). *Rpv2*, associé au groupe de liaison 18, provoquerait une inhibition de la sporulation du pathogène et *Rpv1*, associé au groupe de liaison 12, ralentit sa progression mais autorise une sporulation limitée (Merdinoglu *et al.*, 2003).

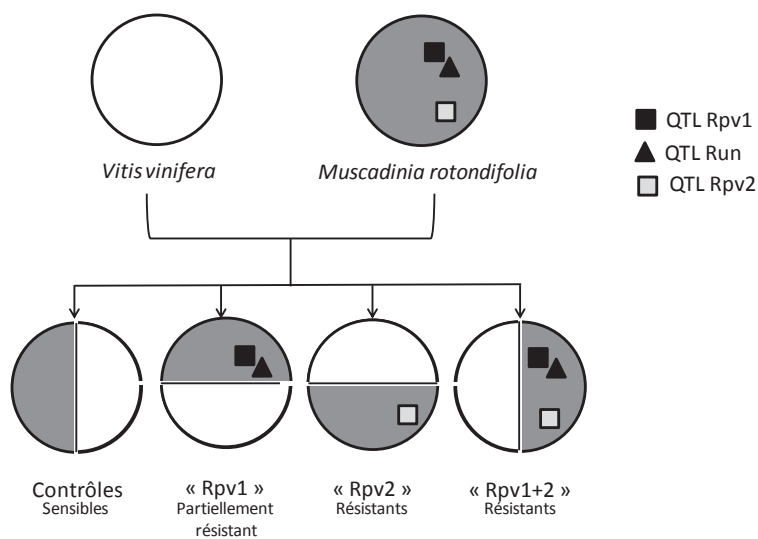


Figure 23: Schématisation des croisements effectués entre *Vitis vinifera* et *Muscadina rotundifolia* pour introgresser les QTLs de résistance Rpv1 (■) et Rpv2 (□) (Résistance *Plasmopara viticola*) (Backcross1). Le QTL Rpv1 est lié au QTL de résistance à l'oïdium (Run1, ▲) (Merdinoglu *et al.*, 2003).

La résistance monogénique à l'oïdium (Run1) est génétiquement liée à Rpv1, locus de résistance partielle au mildiou (Bellin *et al.*, 2009 et Barker *et al.*, 2005).

Le séquençage de la région Rpv1/Run1 révèle la présence d'un cluster de RGAs (Resistance Gene Associated) codant pour des protéines de type TIR-NBS-LRR. Au total, 11 RGA ont été identifiés à ce locus (Dry *et al.*, 2010).

Aujourd'hui, grâce au séquençage récent du génome de la vigne, les scientifiques espèrent trouver d'autres QTLs impliqués dans les mécanismes de défense et les transférer à la vigne par rétrocroisement ou par transfert génétique.

5.2. Vignes transgéniques

L'analyse fonctionnelle d'un gène est une approche expérimentale qui permet d'assigner une fonction aux gènes et de déterminer comment les gènes interagissent. Elle se concentre sur les aspects dynamiques d'un système biologique comme la transcription de gène, la traduction et des interactions de protéine-protéine, par opposition aux aspects statiques des informations génomiques contenues dans l'ADN.

Différentes méthodes existent pour étudier la fonction des gènes d'une plante :

- la mutagenèse permet de produire différentes mutations dans le génome, ayant différents effets : inactivation, dérégulation de l'expression des gènes ou modification du fonctionnement des protéines pour lesquelles ils codent. La mutagenèse peut être ciblée et volontaire (dirigée) ou aléatoire, ponctuelle (SNP) ou concernée une partie du génome (insertion- délétion).

Cette démarche, délicate chez la vigne en raison de ses caractéristiques biologiques (auto-incompatibilité) est alors réalisée dans des plantes modèles (*Arabidopsis thaliana* ou *Medicago truncatula*).

- la manipulation ectopique d'expression de gène *via* la surexpression ou *via* l'extinction de l'expression d'un gène (« silencing »).

Les gènes de résistance notamment ceux codant pour les PR protéines sont très attractifs en tant que candidats à l'introgession dans des cultivars de vigne sensibles pour augmenter leur niveau de résistance. Ainsi l'intégration d'un gène de chitinase de classe I du riz (*Oryza sativa*) dans des plants de vigne (*Vitis vinifera*) confère une résistance à *Erysiphe necator* (oïdium) (Yamamoto *et al.*, 2000 et Nirala *et al.*, 2010), ou encore des plants de vigne exprimant les gènes de l'endochitinase de *Trichoderma harzianum* présentent une résistance contre des pathogènes et produisent 10 à 100 fois plus de chitinases que les plants non transformés (Reisch *et al.*, 2003 et Ali *et al.*, 2003). Concernant la lutte anti-virale, des vignes transgéniques exprimant des gènes de résistance viraux ont été obtenues par l'introduction de gènes de protéine du manteau viral. Les plants transgéniques obtenus par embryogenèse somatique expriment un gène codé par le Grapevine Fanleaf Virus (GFLV, virus responsable de la maladie du court-noué) sont résistants à ce virus (Maghuly, *et al.*, 2006).

5.3. Elicitation des défenses naturelles de la vigne

La stratégie de stimulation des défenses de plante (SDP) revêt un intérêt particulier pour cette culture en tant qu'alternative ou complément aux traitements chimiques. Par l'application d'éliciteurs généraux ou spécifiques, organiques ou inorganiques, il est possible d'amplifier le niveau basal de défense de la plante. Ainsi grâce à l'immunité acquise, la plante opposera immédiatement, dès l'arrivée du pathogène, une résistance suffisante pour limiter, voire empêcher son développement. Divers éliciteurs sont connus comme étant susceptibles de stimuler les défenses de la vigne.

Les éliciteurs biotiques correspondent en général à des molécules issues de la plante (éliciteurs endogènes) ou de microorganismes (éliciteurs exogènes), de nature oligosaccharidique, glycoprotéique, peptidique ou lipidique (Vidhyasekaran, 1993, Lyon, 2007).

Une fois reconnus par la plante à l'aide de récepteurs spécifiques, ils induiront des modifications moléculaires et biochimiques conduisant à l'activation des réactions de défense

de type structural (renforcement de la paroi) ou biochimique (synthèse de phytoalexines et de protéines de défense). Les éliciteurs généraux peuvent être soit d'origine abiotique ou biotique (e.g. Microbe-Associated Molecular Pattern ou MAMPs), vont induire des réponses de défense générale précoces décrites précédemment (chapitre 4.2).

5.3.1. Eliciteurs d'origine biotique

Il existe une grande variété d'éliciteurs biotiques, d'origine animale, végétale, fongique ou bactérienne. Citons à titre d'exemple :

- L'acide cholique, un acide biliaire également retrouvé dans les fèces des animaux et notamment dans les composts utilisés en tant que fertilisants, protège le riz (*Oryza sativa*) contre des attaques d'un champignon pathogène (*Magnaporthe grisea*) en induisant une réaction hypersensible résultant de l'accumulation de PR protéines et de phytoalexines au site de l'infection (Koga *et al.*, 2006).

- L'utilisation de formes avirulentes (*Leptosphaeria biglobosa*) de champignons pathogènes permet de diminuer significativement les symptômes causés par *Leptosphaeria maculans* sur le colza (*Brassica napus* L.) (Huang *et al.*, 2011).

- Les oligosaccharides qui proviennent de la dégradation des parois de la plante (oligogalacturonides) ou du pathogène (oligochitine ou oligoglucanes) suite à l'action d'enzymes spécifiques produites par l'hôte (glucanases, chitinases, polygalacturonases ou pectinases). Pour protéger des pousses de millet (*Penisetum glaucum*) contre *Sclerospora graminicola*, Hindumathy *et al.* (2006) appliquent un extrait saccharidique d'*Aspergillus niger* sur les graines qui induit une augmentation de l'activité peroxydase (PR protéines), et un renforcement des parois végétales par accumulation de lignine et dépôt de callose. Parmi les oligosaccharides, le chitosan (β , 1-4 glucane, ElexaTM homologué par Glycogenesys Inc.), un dérivé déacétylé de la chitine (N-glucosamine), a été montré comme efficace dans de nombreux patho-systèmes protégeant ainsi la tomate, le tabac, le concombre et la vigne contre des champignons pathogènes (Ma *et al.*, 2011 ; Varnier *et al.*, 2009 ; Jayaraj *et al.*, 2008 ; Trotel-Aziz *et al.*, 2006 ; Faoro *et al.*, 2008 et Iriti *et al.*, 2011). L'efficacité du chitosan a été montrée contre l'oïdium (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) de l'orge (*Hordeum vulgare*), ainsi que son activité antivirale sur le tabac (*Nicotiana tabacum*) (Falcon-Rodriguez *et al.*, 2009), le haricot (*Phaseolus vulgaris*) (Iriti *et al.*, 2006, Faoro *et al.*, 2008, Iriti et Faoro, 2008), et contre le *Botrytis* de la vigne (Trotel-Aziz *et al.*, 2006). La résistance induite des plantes par le chitosan est associée à l'accumulation de phytoalexines dans les tissus végétaux traités, en raison de la stimulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, un effet typique de l'établissement SAR (Hammerschmidt 1999, Iriti *et al.*, 2011 et Aziz *et al.*, 2007). L'élicitation de cette voie de biosynthèse par le chitosan a également été rapportée dans d'autres plantes et corrélée à l'augmentation de la transcription de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et de la chalcone synthase (CHS), deux enzymes clés de la voie des phénylpropanoïdes (Nandeeshkumar *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2009).

- La laminarine, un oligosaccharide (β , 1-3 glucane - Iodus 40[®], homologué par la société Goëmar) ou son dérivé sulfaté (PS3), extraite de l'algue brune *Laminaria digitata*, induit une résistance de la vigne contre *P. viticola* et *B. cinerea* (Trouvelot *et al.*, 2008 ; Aziz *et al.*, 2003), ou du blé contre l'oïdium (*Blumeria graminis*, Renard-Merlier *et al.*, 2007).

- L'application d'un extrait préparé à partir d'une algue verte *Ulva armoricana* induit la protection de *Medicago truncatula* contre une infection par *Colletotrichum trifolii*, associée à l'expression du gène marqueur de défense de type *PR10* (Cluzet *et al.*, 2004). Les molécules

actives dans cet extrait d'algue correspondent à des ulvanes, complexes d'hétéropolysaccharides sulfatés (rhamnose, xylose et acides uroniques) (Jaulneau *et al.*, 2011). Les ulvanes induisent une signature d'expression génique similaire à celle observée lors du traitement au méthyle jasmonate (Jaulneau *et al.*, 2010, 2011).

- Les peptides ou glycoprotéines qui sont produits par des pathogènes d'origine fongique, bactérienne ou végétale. Une glycoprotéine issue de la paroi cellulaire de *Phytophthora megasperma* est responsable d'une activité élicitrice dans le persil (*Petroselinum crispum*) (Parker *et al.*, 1991).

- Les harpines, riches en glycine, sont isolées à partir des bactéries *Erwinia* et *Pseudomonas* (Messenger®, homologué par la société Eden Biosciences) (Peng *et al.*, 2011), la cryptogéine (élicitrine β) isolée de *Phytophthora cryptogea*, la systémine identifiée chez les Solanacées (El Oïrdi *et al.*, 2011 ; Corrado *et al.*, 2011 et Yamaguchi *et al.*, 2011), ou encore la flagelline qui constitue les flagelles des bactéries (Van Loon *et al.*, 2008) permettent la mise en place des défenses en activant les voies de l'acide salicylique et du jasmonate en induisant la production de PR protéines.

- Des lipides issus des membranes cellulaires de certains champignons possèdent des activités élictrices. C'est notamment le cas de l'acide arachidonique (Garcia-Pineda *et al.*, 1999 et 2004), l'ergostérol, un stérol majeur de la membrane des champignons à l'exception toutefois des oomycètes, des oïdiums et des rouilles (Rossard *et al.*, 2010) et des sphingolipides (Saucedo-Garcia *et al.*, 2011) qui induisent une cascade de MAPkinase conduisant à la mort programmée des cellules mise en place lors des réactions d'hypersensibilité pour confiner l'agent pathogène au site de l'infection.

- *Pythium oligandrum* est connu pour ses activités antagonistes contre plusieurs espèces de champignons pathogènes. Il produit un éliciteur des défenses des plantes nommé oligandrine, qui appartient à la famille des élicitines (protéine de 10-kDa synthétisée par les espèces de *Phytophthora* et de *Pythium*). *P. oligandrum* ou l'oligandrine, appliquée au niveau racinaire, limite la progression de *Botrytis cinerea* sur vigne en induisant des changements au niveau ultrastructural et au niveau moléculaire (Mohamed *et al.*, 2007).

Le monde végétal a fourni de nombreux éliciteurs. Parmi les plus connus, nous pouvons citer :

- L'extrait de renoué (*Fallopia sacchalinensis*) (Milsana®, homologué par la société KHH BioSci Inc.), appliqué en préventif, protège bien les cultures maraîchères (Fofana *et al.*, 2002 et Bardin *et al.*, 2008). Il provoque des modifications au niveau ultrastructural associées à des modifications au niveau biochimique par l'accumulation de composés phénoliques au niveau du site de l'infection.

- Un extrait de plante (*Trigonella foenum-graecum* L, Stifenia® commercialisé par la société Soft) a récemment bénéficié d'une autorisation provisoire d'homologation sur vigne en tant que SDN pour lutter contre l'oïdium de la vigne. Une défensine de *Trigonella foenum-graecum* a été isolée et identifiée. Elle présente une activité inhibitrice contre un large spectre des pathogènes fongiques, dont *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme* et *Phaeoisariopsis personata* (Olli *et al.*, 2006 et 2007). Toutefois, au vignoble les résultats en terme de protection sont faibles.

- D'autres éliciteurs issus de plante ont montré des efficacités de stimulation de défenses. La bardane (*Arctium lappa*) protège de façon limitée mais significative la tomate contre des attaques de *Botrytis cinerea* (Lin *et al.*, 2005)

- Un extrait de racine de rhubarbe (*Rheum palmatum*) et un extrait d'écorce de bourdaine (*Frangula alnus*) ont été évalués sur le mildiou de la vigne (*P. viticola*) et une inhibition significative du développement de l'agent pathogène a été obtenue. Les mécanismes de défense induits reposent principalement sur la stimulation de la synthèse delta-viniferin (le plus toxique des stilbènes pour *P. viticola*) (Gindro *et al.*, 2007b).

5.3.2. Eliciteurs d'origine synthétique

Les éliciteurs abiotiques sont des composés de nature minérale ou organique. Parmi les nombreux produits chimiques utilisés pour induire la résistance de la plante, figurent l'acide β amino butyrique (BABA), l'acide salicylique (AS) ou ses analogues fonctionnels comme l'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA), l'acibenzolar-S-méthyl (ASM) ou benzothiadiazole (BTH) et l'acide jasmonique ou son analogue le méthyl jasmonate (Belhadj *et al.*, 2006 et 2008a), ou encore l'éthylène (éthéphon) (Belhadj *et al.*, 2008b et Faurie *et al.*, 2009).

5.3.2.1. BABA

L'acide β -aminobutyrique (BABA), est un acide aminé non protéique, prometteur en raison de son caractère d'origine naturelle (Zimmerli *et al.*, 2000), qui élicite les réactions de défense dans les tissus végétaux (Jakab *et al.*, 2001) et agir sur la croissance fongique (Tavallali *et al.*, 2008). Des recherches ont indiqué que le BABA pourrait inhiber la croissance de *Penicillium digitatum* Sacc. (Porat *et al.*, 2003), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Marcucci *et al.*, 2010), et *B. cinerea* Pers. (Fischer, *et al.*, 2009) et *Bremia lactucae* (Pajot *et al.*, 2001), d'une manière dose-dépendante. Généralement, un traitement avec le BABA induit des réponses impliquant des activités chitinase, β -1,3-glucanase et peroxydase chez l'artichaut (Marcucci *et al.*, 2010), l'expression de la phénylalanine ammononia lyase et de chitinases dans les pamplemousses (Porat *et al.*, 2003), l'accumulation de phénols et de phytoalexines dans la pomme de terre (Andreu *et al.*, 2006). L'acide β -aminobutyrique (BABA), reconnu comme un inducteur de la résistance locale et systémique au niveau des feuilles de vigne contre *P. viticola*, augmente l'accumulation de PR1 (PR protéine de classe 1), PR2 (PR protéines de classe 2, regroupant les protéines ayant une fonction β -1,3-glucanase), de chitinases et de diterpénoïdes (Cohen *et al.*, 2010). Il induit également un dépôt de callose (Ton *et al.*, 2004) et de lignine dans les cellules permettant de limiter l'infection d'agent pathogène comme le mildiou (Cohen *et al.*, 2010).

5.3.2.2. L'acide salicylique et ses analogues

Malamy *et al.*, (1990) rapporte pour la première fois que les niveaux endogènes d'acide salicylique (AS) sont directement corrélés avec le niveau de résistance du tabac au virus de la mosaïque (VMT). Ainsi, l'augmentation d'acide salicylique précède-t-elle l'induction de gènes codant pour des PR protéines.

Des progrès considérables ont été faits sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* pour identifier les gènes impliqués dans la mise en place des mécanismes de défense de la plante. Le gène NPR1 ("Nonexpressor of PR gènes 1") a été identifié comme un régulateur clé de la voie de signalisation dépendante de l'acide salicylique qui contrôle l'expression de gènes codant pour *PR1*, *PR2* (β 1-3 glucanase) et *PR5* (thaumatine-like) (Bai *et al.*, 2011).

L'AS est un signal endogène pour l'activation de la résistance systémique induite (ISR) et la caractérisation de produits de synthèse capables de mimer son action a été réalisée. Ainsi, l'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA) et son ester méthylique (tous deux référencés sous le nom de l'INA) ont été les premiers composés de synthèse décrits comme activateurs de l'ISR, offrant ainsi un large spectre de résistance aux maladies (Conrath *et al.*, 2001 ; Ryals *et al.*, 1996). L'AS, l'INA (mal tolérée par certaines cultures) et le benzothiadiazole (BTH) ou acibenzolar-S-méthyl (Friedrich *et al.*, 1996 ; Görlach *et al.*, 1996 et Lawton *et al.*, 1996) semblent activer l'ISR à travers un mécanisme de signalisation similaire (Ryals *et al.*, 1996) étroitement associée à l'activation transcriptionnelle de gènes codant pour les PR protéines (chitinases, 1-3, β glucanases et taumatine-like, Tableaux 9 et 10) (Ziadi *et al.*, 2011) et conduit à une surexpression de la PAL (Sticher *et al.*, 1997).

Cependant, des études récentes suggèrent que la résistance induite par des agents pathogènes ou l'application de produits chimiques affectent également le métabolisme primaire des plantes. L'analyse différentielle de marqueurs de séquence exprimés (EST) dans le cacao (*Theobroma cacao* L.) lors de la réponse précoce à un traitement BTH révèle une sur-expression de 68 gènes, impliqués dans les mécanismes de défense, la synthèse de protéines impliquées dans la photosynthèse, le transport, l'organisation et la communication cellulaire (Verica *et al.*, 2004). Une analyse comparable sur les plants de café (*Coffea arabica* L.) a montré une sur-régulation de 55 gènes, principalement liés à la défense, et la dérégulation de 16 gènes dans les feuilles (De Nardi *et al.*, 2006). Une plus grande fraction de gènes a été réprimée dans les racines, la plupart d'entre eux sont impliqués dans le métabolisme primaire. Une troisième étude, décrivant les modifications induites par le BTH au niveau transcriptionnel, montre une sur-expression de 9 à 24 gènes dans le blé, en fonction de la durée d'échantillonnage (Pasquer *et al.*, 2005).

Le BTH induit une résistance chez le framboisier nain (*Rubus arcticus*) contre le mildiou (*Peronospora sparsa*). Des études protéomiques ont permis d'étudier les changements effectués dans les feuilles et d'identifier les protéines qui jouent un rôle putatif dans la résistance aux maladies (Hukkannen *et al.*, 2008). Il induit une modification du profil protéique des feuilles. En effet, huit protéines sont détectées uniquement dans les plantes traitées avec le BTH. L'accumulation de flavanone 3-hydroxylase (*F3H*), d'alanine aminotransférase, de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase (*ACC*), de *PR1* et de *PR10* permet d'expliquer en partie la résistance induite par le BTH contre *P. sparsa*. Cependant, d'autres changements protéiques semblent être également impliqués (métabolisme énergétique, et transformation des protéines).

La diminution de l'ATP synthase, de la triose-phosphate isomérase, de l'aldolase bisphosphate fructose et de la glutamine synthétase suggère que le BTH provoque d'importants changements dans le métabolisme primaire, fournissant ainsi une explication possible de la faible croissance végétative observée dans les plantes traitées avec le BTH (Hukkannen *et al.*, 2008).

5.3.2.3 .Phosphonates ou phosphites

Les phosphites, utilisés comme engrais ou fongicides, ont un mode d'action complexe en tant que molécules fongicides, impliquant à la fois des effets directs et indirects, et une stimulation forte et rapide des mécanismes de défense des plantes (Smillie *et al.*, 1989 ; Guest

Tableau 9: Tableau récapitulatif des utilisations du BTH sur divers plantes.

Plantes	Dose utilisée de BTH	Pathogènes				Maladie	Auteurs	Year
		Nom	Règne	Division	Région			
Arabette	0,3 mM	Aucun	Phytoplasma / Cicadelle	phytoplasma	X disease	Thi et al., 2009	2009	
	1,2-4,8 mM	<i>Xp phytoplasma / Colladonus montanus</i>	Bacteria	Pseudomonas	Moucheture bactérienne	Bressan et Purcell, 2005	2005	
	0,3 mM	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	Pseudomonas	Moucheture bactérienne	Conrath et al., 2001	2001	
	0,3 mM	Aucun	Bacteria	Pseudomonas	Moucheture bactérienne	Dao et al., 2009	2009	
	1-10 mM	<i>Xanthomonas oryzae pv oryzae</i>	Bacteria	Bacteria	Pourriture noire	Lawton et al., 1996	1996	
	350 nM à 350 µM	Aucun	Bacteria	Bacteria	Pourriture noire	Bai et al., 2011		
	1 mM	<i>Fusarium graminearum</i>	Fungi	Ascomycète	Fusariose	Canet et al., 2010		
Blé	60 g/L	Aucun	Fungi	Ascomycète	Fusariose	Yu et Muehlbauer, 2001	2001	
	30 g/ha	<i>Erysiphe graminis</i>	Fungi	Ascomycète	Oïdium	Pasquer et al., 2005	2005	
	0,5 g/L	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Fungi	Ascomycète	Helminthosporiose	Gorlach et al., 1996	1996	
	0,2 g/L	<i>Verticillium dahliae</i>	Fungi	Ascomycète	Verticilliose	Perello et Dal Bello, 2011		
	0 à 1 mM	Aucun	Fungi	Ascomycète	Verticilliose	Cavalcanti et al., 2008		
	0,015 to 0,075 mg/mL	<i>Peronospora parasitica</i>	Chromista	Oomycète	Mildiou	Wise et al., 2011		
	1,2-2,4-4,8 mM	<i>candidateus asteris</i>	Phytoplasma	Oomycète	Mildiou	Ziadi et al., 2001	2001	
	0,025-0,075 g/L	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fungi	Ascomycète	phytoplasma	D'Amelio et al., 2010	2010	
	5-10-15-20-25 ppm	<i>Colletotrichum destructivum</i>	Fungi	Ascomycète	Fusariose	Whan et al., 2008		
	2,8 mM	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Fungi	Ascomycète	Anthracnose	Latunde-Dada et al., 2001	2001	
Melon	50 ppm	<i>Puccinia psidii</i>	Fungi	Basidiomycète	Oïdium	Würms et al., 1999	1999	
	0,025-0,2-0,3 g/L	<i>Peronospora sparsa</i>	Chromista	Oomycète	Rouille	Boava et al., 2010		
	0,2 g/L	Aucun	Fungi	Oomycète	Mildiou	Hukkannen et al., 2008	2008	
	0,3 mM	<i>Uromyces appendiculatus</i>	Fungi	Basidiomycète	Mildiou	Cao et al., 2011 b		
	50 mg/L	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Fungi	Ascomycète	Rouille	Maffi et al., 2011		
	100 mg/L	<i>Alternaria alternata</i>	Fungi	Dematiaceae	Anthracnose	Lin et al., 2011		
	50 µg/mL	<i>Fusarium</i>	Fungi	Ascomycète	Rouille	Zhang et al., 2011		
	50 µg/mL	<i>Didymella bryoniae</i>	Fungi	Ascomycète	Pourriture noire	Buzi et al., 2004 a,b	2004	
	0,5-1-2 mM	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Fungi	Ascomycète	Pourriture blanche	Dai et al., 2010	2010	
	1 mM	Aucun	Fungi	Ascomycète	Fusariose	Gondim et al., 2008	2008	
Orge	100 ppm	<i>Fusarium pallidoroseum</i>	Fungi	Ascomycète	Fusariose	Walters et al., 2011		
	0,3 mM	<i>Blumeria graminis</i>	Fungi	Ascomycète	Oïdium			
	1-5-25-10 µM	<i>Rhynchosporium secalis</i>	Fungi	Ascomycète	Echaudage de l'orge			
	100 ppm	<i>Ramularia collo-cygni</i>	Fungi	Ascomycète	Maladie de talon			
	0,3 mM	<i>Blumeria graminis sp hordei</i>	Fungi	Ascomycète	Oïdium			
	1-5-25-10 µM	<i>Blumeria graminis</i>	Fungi	Ascomycète	Oïdium	Wiese et al., 2004	2004	
	0,5 mM	<i>Phytophthora palmivora</i>	Chromista	Oomycète	Oïdium	Faoro et al., 2008	2008	
	0,2 g/L	<i>Phytophthora palmivora</i>	Chromista	Oomycète	Mildiou	Zhu et al., 2003	2003	
	5-20-50-100 µM	<i>Penicillium expansum</i>	Fungi	Ascomycète	Moisissure	Qiu et al., 2004	2004	
	0,03-0,3-1,4 mM	Aucun	Fungi	Ascomycète	Moisissure	Cao et al., 2011 a	1998	
Pois	0,06 -0,13 g/L	<i>Botrytis cinerea</i>	Fungi	Ascomycète	Pourriture grise	Kulek et al., 2002	2002	
	10 mM	<i>Ewinia amylovora</i>	Bacteria	Probactérie	Bacteria	Mazucchi et Brunelli, 2011		
	0,5 mM	<i>Uromyces pisi</i>	Fungi	Basidiomycète	Rouille	Barilli et al., 2009 a,b		
	200-400 ppm	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bacteria	Probactérie	Bactériose vasculaire	Yang et al., 2011		
	0,04%	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Bacteria	Probactérie	Bactériose vasculaire	Bengtsson et al., 2009		
	50-100 mg/L	<i>Venturia inaequalis</i>	Fungi	Ascomycète	Maladie de la tavelure du pois	Skłodowska et al., 2010	2010	
	50-100 mg/L	<i>Erwinia amylovora</i>	Bacteria	Protéobactérie	Feu bactérien	Bokshi et al., 2003	2003	
	50-100 mg/L	<i>Fusarium semitectum</i>	Fungi	Ascomycète	Ascomycète			

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des utilisations du BTH sur divers plantes (suite).

Plantes		Dose utilisée de BTH	Nom	Règne	Pathogènes	Division	Maladie	Auteurs
Riz	<i>Oryza sativa</i>	10-100-1000 mM	<i>Xanthomonas oryzae pv oryzae</i>	Bacteria	Probactérie	Probactérie	Pourriture noire	Chen <i>et al.</i> , 2007
		0,1-1-10-100-250 µg/mL	<i>Rhizoctonia solani</i>	Fungi	Basidiomycète	Basidiomycète		Rohilla <i>et al.</i> , 2002
		1-10-100 µg/mL	<i>Xanthomonas oryzae pv oryzae</i>	Bacteria	Protéobactérie	Protéobactérie	Pourriture noire	Babu <i>et al.</i> , 2003
Rose	<i>Magnaporthe oryzae</i>	0,3-3-30-300-3000 mM	Aucun					Song <i>et al.</i> , 2002
		0,3 mM	<i>Xanthomonas oryzae pv oryzae</i>	Bacteria	Probactérie	Probactérie	Pourriture noire	Feng <i>et al.</i> , 2011
		250 µM	<i>Meloidogyne graminicola</i>	Animal	Nématode	Nématode	Galle du riz	Nahar <i>et al.</i> , 2011
Soja	<i>Glycine max</i>	50 mM	<i>Diplacarpae roseae</i>	Fungi	Ascomycète	Ascomycète		Suo <i>et al.</i> , 2001
		400 mg/L	<i>Glomus mossae</i>	Bacteria	Glomeromycota	Glomeromycota	Endomycorrhhyze	De Roman <i>et al.</i> , 2011
		80 mg/L	<i>Glomus japonicum</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Bacteria	Glomeromycota Bacteria	Glomeromycota Probactérie	Endomycorrhhyze Symbionte	Faessel <i>et al.</i> , 2010
Tabac	<i>Nicotiana benthamiana</i>	1,2 mM	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Fungi	Ascomycète	Ascomycète	Anthracnose	Cortes-Barco <i>et al.</i> , 2010
		25-37,5 g/ha	<i>Peronospora hyoscyami sp tabacina</i>	Chromista	Oomycète	Oomycète	Mildiou	Perez <i>et al.</i> , 2003
		1,4 mM	18 different families of fungi	Fungi	Ascomycète	Ascomycète		Friedrich <i>et al.</i> , 1996
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1,5 mM	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fungi	Ascomycète	Ascomycète	Fusariose	Benhamou and Belanger, 1998
		1,2 mM	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Insect	Hémiptères	Hémiptères	Insect (Aphid)	Cooper <i>et al.</i> , 2004
		52 g/ha	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	Pseudomonas	Pseudomonas	Moucheture bactérienne	Herman <i>et al.</i> , 2008
Tournesol	<i>Helianthus annuus</i>	0,3 mM	<i>Botrytis cinerea</i>	Fungi	Ascomycète	Ascomycète	Pourriture grise	Malolepsza, 2006
		1,2 mM	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	Pseudomonas	Pseudomonas	Moucheture bactérienne	
		1,25 mg/L	<i>Frankliniella occidentalis</i> <i>Spodoptera exigua</i>	Insect Insect	Thysanoptera Lepidoptère	Thysanoptera Lepidoptère	Insect (Thrips) légiomnaire de la betterave	Thaler <i>et al.</i> , 1999
Vigne	<i>Vitis vinifera</i>	1,25 mg/L	<i>Myzus persicae</i>	Insect	Hémiptère	Hémiptère	Insect (Aphid)	Civolani <i>et al.</i> , 2010
		160 mg/L	<i>Plasmopara halstedii</i>	Chromista	Oomycète	Oomycète	Mildiou	Kórósi <i>et al.</i> , 2011
		0,3 mM	Aucun	Phytoplasma	Phytoplasma	Phytoplasma		Romanazzi <i>et al.</i> , 2009
Vigne	<i>Vitis vinifera</i>	80 mg/L	<i>Botrytis cinerea</i>	Fungi	Ascomycète	Ascomycète	Pourriture grise	Iriti and Faoro, 2004
		0,5 g/L	Aucun					Le Henaff <i>et al.</i> , 2009
		0,5 g/L	<i>Plasmopara viticola</i>	Chromista	Oomycète	Oomycète	Mildiou	Perazzoli <i>et al.</i> , 2008
		0,5 g/L	<i>Plasmopara viticola</i>	Chromista	Oomycète	Oomycète	Mildiou	Perazzoli <i>et al.</i> , 2010
		0,5 g/L	<i>Plasmopara viticola</i>	Chromista	Oomycète	Oomycète	Mildiou	Perazzoli <i>et al.</i> , 2011
		10 g / 100 L	<i>Plasmopara viticola</i> <i>Erysiphe necator</i>	Chromista Fungi	Oomycète Ascomycète	Oomycète Ascomycète	Mildiou Oidium	Reuveni <i>et al.</i> , 2001 Campbell et Latorre,

et al., 1991; Jackson *et al.*, 2000 ; Hardy *et al.*, 2001 et Daniel *et al.*, 2005). Ils conduisent à la synthèse et au transport de métabolites secondaires tels que les phytoalexines (Bompeix *et al.*, 1981 ; Nemestothy *et al.*, 1990; Fenn *et al.*, 1985 et 1989 ; Guest., 1984 et 1989).

Le fosétyl-aluminium [aluminium tris (éthyl phosphonate)], est un phosphonate utilisé contre les maladies causées par les oomycètes. Ce fongicide dont le mode d'action est complexe, a fait l'objet de nombreuses études sur son rôle comme inducteur de phytoalexines (Bompeix *et al.*, 1981 ; Saindrenan *et al.*, 1988 et 1990 ; Jackson *et al.*, 2000; Nemestothy et Guest, 1990).

Le Fosétyl-Al est hydrolysé dans la plante en ion phosphonate (Fenn et Coffey, 1985, 1989). Le fait que ce phosphonate inhibe la croissance du mycélium des Oomycètes, confirme l'hypothèse que le fosétyl-Al a un effet direct fongicide conjointement à son mode d'action indirecte. Les phosphonates sont décrits comme présents dans les plantes à des concentrations qui induirait un stress physiologique chez l'agent pathogène, qui libérerait ainsi des substances reconnues par la plante et provoquerait les réactions de défenses de l'hôte (Guest, 1984 et 1989).

D'autres produits chimiques dont la matière active est composée de phosphonates sont commercialisés (Nutri-Phite®, Ele-Max® et Phytogard®) et plus récemment un nouveau fongicide-stimulateur, le LBG, a été homologué sur vigne. Parmi les phosphonates fertilisants, le PK₂ (Proval®, Technidis-Agro), un phosphonate de potassium, augmenterait l'efficacité des traitements contre le mildiou des pommes de terre car il permet de réduire la dose de fongicide par 2 selon le fabricant (Soyez, 2001).

Le temps et l'amplitude ou intensité des réponses de défense de l'hôte est affectée par les phosphonates en modifiant la réponse respiratoire des plantes infectées et en stimulant les défenses de l'hôte notamment *via* l'accumulation de phytoalexines (Guest, 1984 ; Bompeix *et al.*, 1981 ; Guest *et al.*, 1984, 1986 ; Saindrenan *et al.*, 1988 et 1990).

Des sels de phosphate de potassium ou de sodium (K₂HPO₃) sont également capables d'induire une résistance systémique chez le riz (*Oryza sativa*) pour lutter contre la pyriculariose, et stimulent la résistance du concombre contre l'oïdium (Reuveni *et al.*, 2000). L'induction de la résistance est associée à des réactions d'hypersensibilité (production de formes actives de l'oxygène et accumulation d'acide salicylique).

5.3.2.4. Le probénazole

Le probénazole, ou le 3-allyloxy-1,2-benzo-isothiazole-1,1-dioxyde, un précurseur de la saccharine est le SDN de synthèse le plus ancien sur le marché (depuis les années 1970) et aucun développement de résistance d'agents pathogènes au produit n'a été détecté à ce jour. Il protège le riz contre la pyriculariose (*Magnaporthe grisea*) et le feu bactérien (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). Il est absorbé par les racines et induit la synthèse et l'accumulation d'acide salicylique suivies d'une production de PR protéines. L'application de probénazole induit l'accumulation d'acides gras insaturés comme des facteurs anti-conidiens et la lignification des cellules de riz (Kessmann *et al.*, 1994).

6. Objectifs de ce travail

La lutte contre les maladies causées par les pathogènes biotrophes nécessite une utilisation souvent intensive de fongicides. Le vignoble consomme à lui seul plus de 16% des

fongicides commercialisés chaque année en France. Pour réduire leur impact environnemental qui conduit à l'acquisition de la résistance aux pesticides des pathogène et la présence de résidus dans les vins et dans l'atmosphère, des efforts doivent être entrepris pour développer des stratégies de protection innovantes de remplacement ou complémentaires permettant de réduire les intrants pesticides.

L'utilisation d'éliciteurs pour induire des défenses des plantes naturelles, s'avère une méthode alternative et/ou complémentaire intéressante à explorer en termes d'efficacité et de comportement sur la plante. Les plantes sensibles possèdent la "machinerie" nécessaire pour assurer la résistance, mais elle n'est pas activée à un niveau suffisant pour limiter l'infection. La stimulation des défenses des plantes en conditions de laboratoire permet de limiter le développement des bioagresseurs. Toutefois, l'application de cette méthode *in natura* semble plus délicate, et conduit généralement à des efficacités variables, très dépendantes de la génétique de la plante, des conditions environnementales et de la pression parasitaire.

Force est de constater, qu'il paraît important de comprendre les mécanismes mis en place dans la plante, de posséder des outils ou des marqueurs qui nous renseignent sur le statut de résistance de la vigne pour évaluer l'efficacité de ces stimulateurs et mieux connaître leur potentiel de protection dans le cadre de nouvelles méthodes de lutte.

Globalement, l'efficacité de l'éliciteur dépend de nombreux facteurs:

- la plante, en fonction de ses antécédents génétiques, de son âge, de l'organe considéré ou de la persistance des défenses, présentera des capacités variables à se défendre contre les attaques des agents pathogènes,
- l'agent pathogène, en fonction de sa diversité, de son agressivité ou de son pouvoir adaptatif, sa croissance sera plus ou moins limitée et il peut s'adapter à différentes toxines végétales en les détoxiquant,
- les conditions environnementales, telles que les conditions climatiques, vont influencer l'expression du caractère de défense des plantes et/ou du développement des agents pathogènes,
- enfin, la bio-disponibilité du stimulateur.

La mise en place de méthode intégrant l'utilisation de stimulateur sera forcément délicate et forcément préventive.

Toutefois, devant la multiplicité de produits biologiques ou non vantant les mérites d'une stimulation des défenses des plantes, et devant l'intérêt des viticulteurs pour les SDP, il paraît urgent de disposer de connaissances et d'outils qui permettent d'évaluer l'efficacité réelle de ces stimulateurs et de connaître leur potentiel de protection dans le cadre de nouvelles méthodes de lutte, intégrées et durables.

Le développement de méthodes d'évaluation de ces stimulateurs a été entrepris et la mise au point d'une méthode "BioMolChem" *in vitro* a été réalisée.

* Bio : Le test ultime de l'efficacité des défenses d'une plante est avant tout biologique et se caractérise par sa capacité à limiter, voire stopper le développement d'un parasite. Ainsi, en choisissant des souches de mildiou ou d'oïdium, appartenant à différents groupes phénotypiques ou génotypiques, est-il possible d'évaluer l'efficacité d'un SDP en fonction de la variabilité des bioagresseurs, laquelle peut varier considérablement.

* Mol : une plante soumise à une agression, et/ou à une stimulation de ses défenses met en œuvre différents mécanismes, faisant appel à toute une cascade de signalisation moléculaire qui conduiront ou non *in fine* à différents niveaux de protection mécanique et

chimique. Il est possible d'obtenir une vue partielle des défenses mises en place en suivant l'expression de gènes marqueurs impliqués dans ces processus de défenses. Ainsi, le niveau d'expression de 25 gènes de *Vitis vinifera* impliqués dans les défenses (codant pour des PR-protéines ou des enzymes impliquées dans des voies de signalisation hormonale ou de biosynthèse...) est-il mesuré par RT-q-PCR au cours du temps.

* Chem : la vigne est connue pour ses capacités à synthétiser de nombreux polyphénols dont les phytoalexines qui peuvent être impliquées dans la lutte contre les parasites. L'analyse qualitative et quantitative de polyphénols a été réalisée par HPLC.

En faisant varier les composantes de l'interaction plante-pathogène (variabilité inter et intra spécifique des pathogènes, variabilité génétique de la vigne et utilisation de différents produits éliciteurs), l'utilisation de la méthode "BioMolChem" permettra d'établir des corrélations préliminaires entre l'expression de gènes de défenses et la présence de certains stilbènes connus ou inconnus avec un niveau de protection foliaire ou des grappes pour évaluer l'intérêt de l'utilisation de ces indicateurs comme marqueurs de défenses.

Fortes de ces marqueurs permettant de définir l'état de défense de la vigne, nous avons évalué leur intérêt *in natura* au cours de trois années. Ainsi, le potentiel réel de protection d'un SDP a-t-il été testé sur de petites parcelles élémentaires, utilisé seul ou en association avec des fongicides après inoculation artificielle de mildiou ou d'oïdium de la vigne, en utilisant la méthode "BioMolChem". L'objectif vise à évaluer les réponses de défenses de la vigne face à une forte attaque sur vigne et à mieux comprendre comment elles se mettent en place.

Chemin faisant, nous avons recherché si ces éliciteurs présenteraient un intérêt pour augmenter le niveau de défense de plants de vigne hybrides résistants à *P. viticola* et *E. necator*.

Le choix des éliciteurs s'est porté sur deux phosphonates (le fosétyl-Al et un fertilisant foliaire (PK₂), et un analogue de l'acide salicylique le benzothiadiazole (BTH).

Ce travail qui intègre la dimension de la variabilité inter et intra-spécifique de deux parasites biotrophes (*E. necator* et *P. viticola*) se positionne résolument dans une optique de compréhension et d'applications de la stimulation des défenses de la vigne du gène au champ.

Matériels et Méthodes

Matériel et Méthodes

1. Matériels biologiques

1.1 Matériel végétal

1.1.1. En condition contrôlées

Des boutures foliaires de *Vitis vinifera*, cv. Cabernet-Sauvignon et de 4 génotypes, provenant d'un programme d'amélioration variétale réalisé à l'INRA de Colmar et visant à cumuler des sources de résistance ont été utilisées. Une population d'hybrides issus d'un croisement entre *Muscadinia rotundifolia* et *V. vinifera* cv Cabernet Sauvignon (population 8624 sont croisés avec *V. vinifera* cv Cabernet Sauvignon (Back Cross 1- BC1). Ces génotypes ont ainsi introgressé ou non les différents QTLs de résistance conférant de la résistance au mildiou et à l'oïdium issus de la muscadine. Avec le QTL de Résistance à *Plasmopara viticola* 1 ("Rpv1"), localisé sur le chromosome 12 et le QTL de Résistance à *Plasmopara viticola* 2 ("Rpv2"), localisé sur le chromosome 18, les génotypes suivants ont été testés :

- 7054 et 7056, sensibles (sans les QTLs majeurs "Rpv1" et "Rpv2")
- 7001 et 7160 possédants le QTL "Rpv1" associé au QTL de résistance à *Erysiphe necator* 1 ("Run1")
- 7210 possédant le QTL "Rpv2"
- 7164 cumulant les 2 QTLs "Rpv1-Rpv2"

Le QTL "Rpv1" est également lié à un QTL de résistance à l'oïdium de la vigne "Run1" conférant une résistance totale à *Erysiphe necator*.

Les plants, à l'origine, ont été fournis par l'équipe Génétique et Amélioration de la Vigne de l'UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin dirigée par Didier Merdinoglu (GAV-SVQV).

La production s'effectue en serre, à partir de boutures foliaires réalisées à partir de sarments placés dans des terrines de sable. Après 3 à 4 semaines, les boutures enracinées sont rempotées dans un mélange sable-terreau et sont cultivés en serre, avec une photopériode de 16 heures. Le temps minimal pour obtenir des plants comportant 4 à 5 feuilles bien développées est d'environ 4 semaines.

Les troisièmes et quatrièmes feuilles à partir de l'apex de plants âgés de 2 mois ont été utilisées pour les inoculations d'oïdium et de mildiou respectivement. Les expériences au laboratoire ont été réalisées soit sur des feuilles détachées (expression des gènes et analyses biochimiques) soit sur des disques de feuilles de 18 mm de diamètre (tests de croissance des agents pathogènes).

1.1.2. Au vignoble

Les expérimentations ont été réalisées au domaine expérimental de Couhins, constitué de 45 hectares, situé aux portes de Bordeaux, sur un terroir reconnu comme l'un des meilleurs de l'AOC Pessac-Léognan. Le sol est composé d'une couche d'argile qui repose sur une roche calcaire, très bien toléré par le cépage Cabernet Sauvignon greffé sur le porte-greffe Fercal qui présente également une grande tolérance au phylloxera radicole, au mildiou et à l'anthracnose. La conduite en guyot double permet d'obtenir une bonne répartition foliaire et un étalement de la récolte. La parcelle expérimentale est constituée de 4 blocs de trois ceps répétés 4 fois par modalité. (**Annexes 1 à 5**).

1.2. Matériel fongique

1.2.1. *Erysiphe necator*

Le champignon biotrophe *Erysiphe necator*, responsable de l'oïdium de la vigne (*Vitis vinifera*) est un ascomycète haploïde hétérothallique, ectoparasite.

Les souches d'oïdium prélevées sur des parcelles, sont repiquées sur des feuilles maintenues en survie ou conservées sur des vitro-plants de vigne à 15 °C, après un isolement monoconidien. Quinze souches appartenant au groupe génétique A et 12 au groupe B ont été utilisées au cours des expériences (Tableau 11). La détermination du groupe génétique est réalisée par deux méthodes moléculaires : CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), (Amrani et Corio-Costet, 2006 ; Montarry *et al*, 2009) ou par PCR quantitative en temps réel (Dufour *et al*, 2009) utilisant le polymorphisme génétique qui existe entre les deux groupes d'oïdium au niveau du gène de la β -tubuline (tub2, numéro d'accèsion GenBank : AY074934) ou de l'Eburicol-C₁₄-déméthylase (*CYP 51*, numéo d'accèsion GenBank : AF042067) respectivement.

Tableau 11: Caractéristique des souches d'*E. necator* utilisées. (CS : *Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon) ; HC : hybrides issus du croisement *V. vinifera* X *M. rotundifolia* réalisé à l'INRA de Colmar.

Souches	Origine (département)	Date de prélèvement	Groupe génétique	Tests d'efficacité in vitro		Expression gènes		Tests d'efficacité in natura CS
				CS	HC	CS	HC	
BR 33	Carcassonne (11)	2002	A	X				
PVR 43	Roussillon (84)	2003	A	X				
ORA 4	Orange (84)	2003	A	X				
ORA 3	Orange (84)	2003	A	X				
PV 33	Puicheric (11)	2006	A	X				
LLU 70	Llupia (66)	2006	A	X				
PVR38	Roussillon (84)	2005	A	X	X			
LLU 41	Llupia (66)	2006	A	X	X	X	X	
LLU 55	Llupia (66)	2006	A	X	X			
PV15	Puichenic (11)	2006	A	X	X			
A1	Tressere (66)	2009	A		X			
A2	Tressere (66)	2009	A		X			
A3	Tressere (66)	2009	A		X			
A4	Narbonne (11)	2009	A		X			
A5	Filou (11)	2009	A		X			
CC 49	Couhins (33)	1999	B	X				
2B 15	Carcassonne (11)	2000	B	X				
GF 10	Grande Ferrade (33)	2003	B	X				
LAT 12	Latresne (33)	2003	B	X				
PAL 01	Cantenac (33)	2003	B	X				
CHL 02	Pauillac (33)	2004	B	X				
PV 28	Puicheric (11)	2006	B	X				
PV 46	Puicheric (11)	2006	B	X				
PV 74	Puicheric (11)	2006	B	X	X	X	X	X
B1	Bordeaux GF (33)	2009	B		X			
B2	Bordeaux GF (33)	2009	B		X			
B3	Bordeaux GF (33)	2009	B		X			X

1.2.2. *Plasmopara viticola*

Une collection de souches mono-sporange issues de collectes sur le terrain, a été repiquée sur des feuilles de vigne en survie et conservée à – 20°C. Vingt souches présentant des sensibilités différentes à plusieurs fongicides ont été utilisées dans le cadre de la thèse (Tableau 12).

Tableau 12 : Caractéristiques des souches de *P. viticola* utilisées.

Souches	Localités (département)	Année de prélèvement				Tests d'efficacité in vitro sur		Expression gènes sur		Tests d'efficacité in natura
			FAM ¹	I ² PRO	MEF ³	CS	HC	CS	HC	
MAN01	Midi-Pyrénées	2005	S	R	S		X			
MOR08	Morizer (33)	2003	S	S	S		X			
WEI04 *	Pfaffenweiler (Allemagne)	2007	S	S	S		X			
BOM06	Bommes (33)	2003	S	S	R		X			
LAN123	Drome (26)	2004	S	R	R		X			
EAU340	Eauze (32)	2005	R	R	S		X			
CHAS5	Champagne	2007	S	S	R		X		X	
PAU 32	Pauillac (33)	2003	S	S	r	X	X		X	
EAU 08	Eauze (32)	2005	R	R	S	X	X		X	
PIC 59	Couhins (33)	2003	R	S	R	X				
COU 15	Couhins (33)	2003	S	S	S	X		X		
CAS 01	Castillon (32)	2005	R	R	S	X		X		
FLE 01	Fleurie (69)	2004	S	S	S	X				
PV 392	Changin (Suisse)	2010	ND	ND	ND					X
PV 209	Monségur (33)	2009	ND	ND	ND					X
BOM 40	Bommes (33)	2004	R	S	ND					X
MOR 08	Morizès (33)	2003	R	S	S					X
BRI 01	St Brice (89)	2004	S	S	S					X
FRE 01	Freibourg (Allemagne)	2003	R	S	R					X
ROF 02	Rouffignac (17)	2006	R	S	S					X

FAM¹ : Famoxadone, fongicide inhibiteur de la respiration mitochondriale (QoI); **I²PRO** : Iprovalicarbe, fongicide inhibiteur de la biosynthèse de la paroi; **MEF³** : Méfénoxam, fongicide inhibiteur de l'ARN polymérase. **R** : souche résistante au fongicide, **S** : souche sensible au fongicide.

WEI 04* : Souche récoltée sur une parcelle de Regent, variété partiellement résistante au mildiou.

CS : *Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon

1.3. Produits chimiques

1.3.1. Molécules potentiellement élicitrices

- Benzothiadiazole ou BTH (Figure 24A)

Nom IUPAC : S-methyl benzo [1, 2, 3] thiadiazole 7 - carbothioate.
Nom commercial: Bion® 50WG (Syngenta Agro, concentré à 50 %)
Nom usuel : BTH
Formule brute: C₈H₆N₂OS₂
Poids moléculaire : 210,3 g. mol⁻¹

- Fosétyl d'aluminium ou FOS (Figure 24B)

Nom IUPAC: aluminium tris (ethyl phosphonate).
Nom commercial: Aliette® (Rhône-Poulenc, concentré à 80%, non homologué seul contre le mildiou de la vigne ; de 3,75 à 4 Kg/ ha en association)
Formule brute: C₆H₁₈-(PO₃)₃-Al,
Poids moléculaire: 354,1 g. mol⁻¹

- Un fertilisant ou PK₂ (Figure 24C)

Nom IUPAC : Potassium phosphite
Nom commercial : Proval® PK₂ (Société PROVAL à 250 g. L⁻¹ de PO₃²⁻ libéré, homologué contre le mildiou de 1 à 3 L/ ha)
Formule brute: K₂HPO₃
PM = 158 g. mol⁻¹

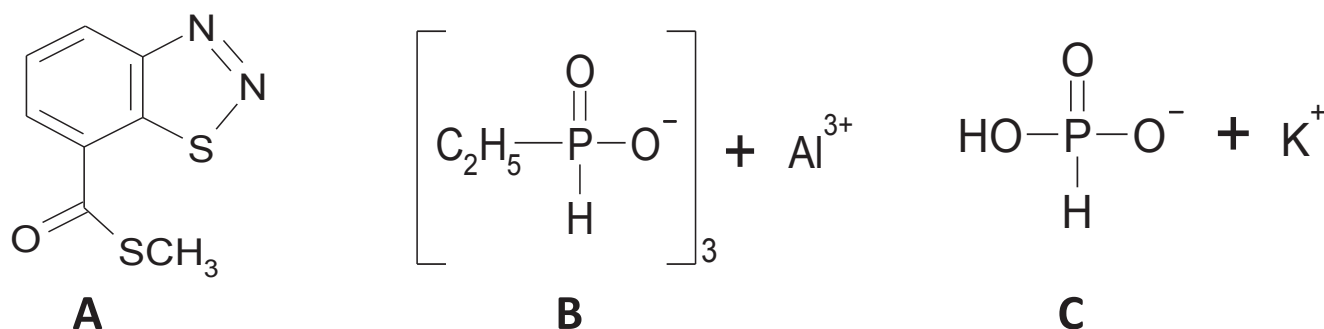


Figure 24 : Formules développées des molécules potentiellement élicitrices testées : (A) BTH ; (B) Fosétyl-Aluminium ; (C) Potassium phosphite (PK₂)

1.3.2. Molécules fongicides

- Mancozèbe

Nom IUPAC: manganese ethylene bis (dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt
Nom commercial: Dithane® (75% WG, Dow AgroSciences) ou Remiltine® (46.5% Mancozèbe en association avec 4% de cymoxanil).
Formule Brute: (C₄H₆MnN₂S₄)_x(Zn)_y,
Poids moléculaire : 271,3 g. mol⁻¹

Fongicide appartenant à la famille des carbamates, de contact, appliqué en préventif, utilisé comme fongicide de référence dans les essais mildiou au vignoble (Dithane®) ou en tant que traitement de couverture dans les essais oïdium (Rémiltine®). La dose homologuée contre le mildiou de la vigne est de 2,1 à 2,8 Kg/ha.

- **Tébuconazole:**

Nom IUPAC : (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol

Nom commercial: Corail® (250g/L, EW, Bayer Corp Science, homologué à 100 g/ha)

Formule brute: C₁₆H₂₂ClN₃O

Poids moléculaire: 307,82 g. mol⁻¹

Fongicide systémique anti-oïdium de la famille des triazoles (du groupe II, inhibiteur de la stérol C₁₄-déméthylase) utilisé comme référence en préventif ou curatif dans les essais oïdium ou comme traitement de couverture dans les essais mildiou.

- **Hydroxyde de cuivre :**

Nom IUPAC : copper II hydroxide

Nom Commercial : Champ® flo (360 g/L, SC, Nufarm, homologué contre le mildiou de la vigne à 720 g/ha)

Formule brute : H₂O₂Cu

Poids moléculaire : 97,56 g. mol⁻¹

Grâce à ses qualités physico-chimiques, ce produit est utilisé à faible dose et remplace les traitements traditionnels au cuivre pour lutter contre le mildiou. Il est utilisé comme fongicide de référence dans les tests de fongitoxicité au laboratoire.

- **Myclobutanil :**

Nom IUPAC : (RS)-2-(4-chlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)hexanenitrile

Nom commercial : Systhane® (200-240 g/L, EW, Dow AgroSciences, homologué contre l'oïdium de la vigne de 30 à 45 g/ha)

Formule brute : C₁₅H₁₇ClN₄,

Poids moléculaire : 288,78 g. mol⁻¹

Le myclobutanil appartient également à la famille des triazoles et agit par systémie, en bloquant la synthèse des stérols. Il est utilisé comme fongicide de référence dans les expériences en conditions contrôlées.

- **Dinocap :**

Nom IUPAC: (RS)-2,6-dinitro-4-octylphényl crotonates & (RS)-2,4-dinitro-6-octylphényl crotonates

Nom commercial: Kérathane® (350 g/L, EC, Dow AgroSciences, homologué contre l'oïdium de la vigne à 210 g/ha)

Formule brute: C₁₈H₂₄N₂O₆,

Poids moléculaire : 364,4 g. mol⁻¹

Fongicide de la famille des phénols de contact à action préventive et curative contre l'oïdium utilisé lors des traitements de couverture des essais mildiou au vignoble.

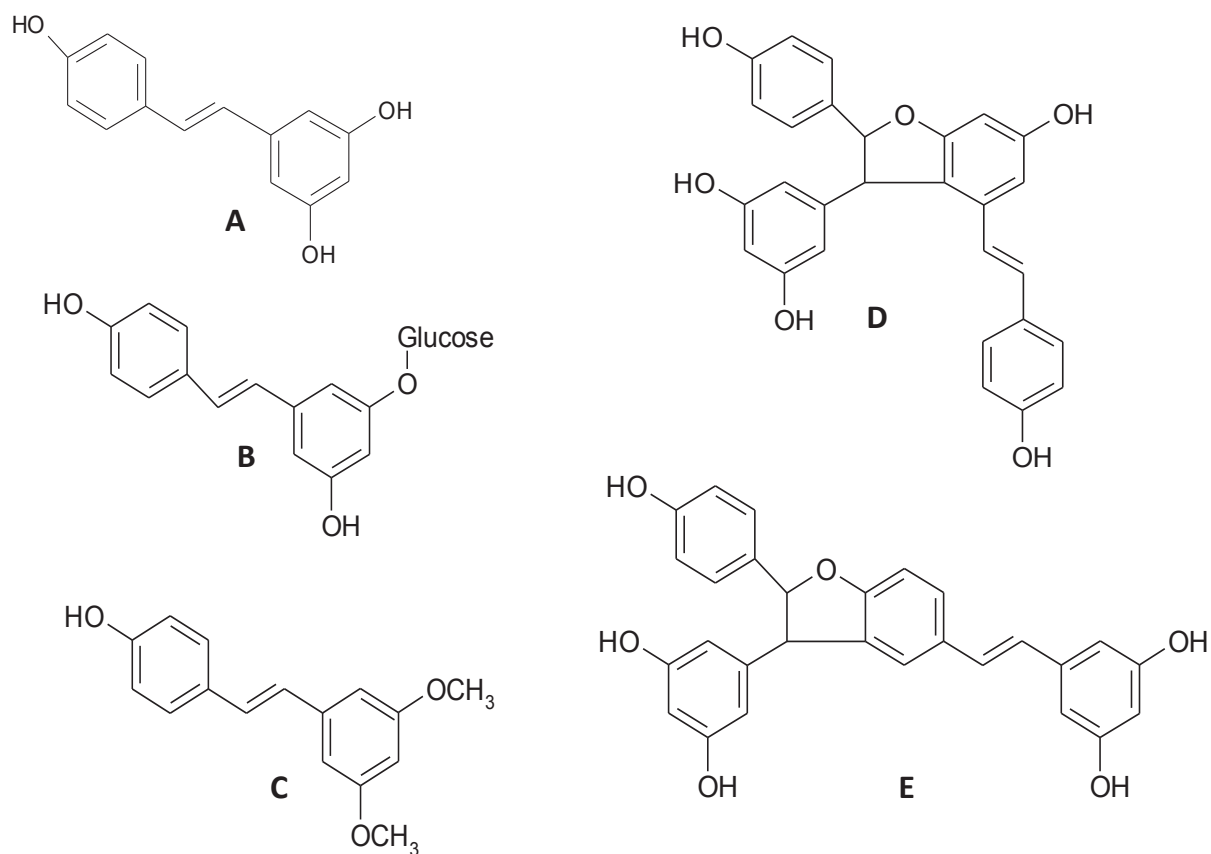


Figure 25: Formules développées des stilbènes de référence : (A) resvératrol ; (B) Picéide ; (C) Ptérostilbène ; (D) δ -viniférine; (E) ϵ -viniférine .

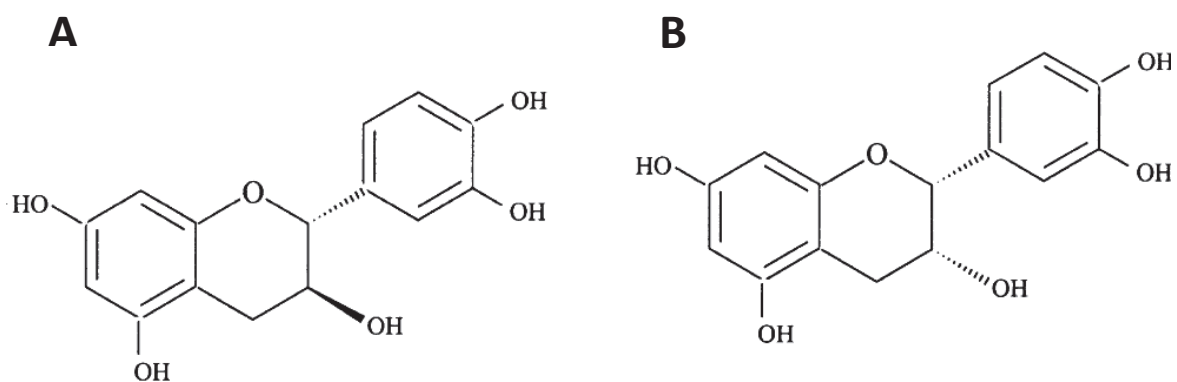


Figure 26 : Formules développées des flavonoïdes de référence : (A) Catéchine ; (B) Epicathéchine

1.3.3. Polyphénols de référence

- **Resvératrol** (Figure 25A)

Nom IUPAC: 3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene, 5-[(1E)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol.

Nom commercial: Resveratrol (Sigma-Aldrich)

Formule brute: C₁₄H₁₂O₃

Poids moléculaire: 228,24 g. mol⁻¹

- **Piceide** (Figure 25B)

Nom IUPAC: Resveratrol 3-O-β-D-glucopyranoside

Nom IUPAC: Polydatin (Sigma-Aldrich)

Formule brute: C₂₀H₂₂O₈

Poids moléculaire : 390,38 g. mol⁻¹

- **Ptérostilbène** (Figure 25C)

Nom IUPAC: 3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene, 4-[(1E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)ethenyl] phenol,

Nom commercial: Pterostilbene (Sigma-Aldrich)

Formule brute: C₁₆H₁₆O₃

Poids moléculaire : 256,30 g. mol⁻¹

- **δ et ε-viniférine** (Figure 25D et 25E)

Les viniférines sont purifiées à partir de feuilles de vigne (ε viniférine) et par réaction enzymatique (δ viniférine) comme décrit par Pezet *et al*, (2004). Ces molécules standard m'ont été fournies par le laboratoire du Pr. J. M. Mérillon (GESVAB-ISVV Bordeaux).

- **Catéchine** (Figure 26A)

Nom IUPAC: (2R, 3S ou 2S, 3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol

Nom commercial : catechin (Sigma-Aldrich)

Formule brute : C₁₅H₁₄O₆

Poids moléculaire : 290,27 g. mol⁻¹

- **Epicatéchine** (Figure 26B)

Nom IUPAC: (2R, 3R ou 2S, 3S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol

Nom commercial : epicatechin (Sigma-Aldrich)

Formule brute : C₁₅H₁₄O₆

Poids moléculaire : 290,27 g. mol⁻¹

2. Méthodes

2.1. Production de matériel fongique

2.1.1. *E. necator*

La troisième feuille étalée de plants de Cabernet-Sauvignon est prélevée, rincée et désinfectée dans une solution à 5 % d'hypochlorite de calcium pendant 10 minutes, sous une hotte à flux laminaire. Après rinçage avec de l'eau distillée stérile et séchage, les disques de feuilles ou les feuilles entières sont placés dans une boîte de Petri, face inférieure en contact avec soit un milieu gélosé (20 g L⁻¹ d'agar contenant 30 mg L⁻¹ de benzimidazole) soit un papier Whatmann humidifié avec 2,5 mL d'eau stérile. Les conidies d'*E. necator* sont inoculées sous conditions stériles. Les feuilles, placées au fond d'une tour en plexiglas, sont inoculées avec des conidies issues de feuilles sporulantes à l'aide d'un aérateur d'aquarium, à raison de 800 ± 220 conidies / cm². Le nombre de conidies déposées est contrôlé par comptage à l'aide d'une cellule de Malassez placée dans la tour d'inoculation parmi les feuilles à inoculer. Les boîtes de Petri sont ensuite placées dans une chambre de culture, avec une photopériode de 16 heures de lumière à 22°C et un éclairage lumineux de 1000 lux (correspondant à une radiation active de photosynthèse (PAR) de 350 µmole/m²/sec).

2.1.2. *P. viticola*

La quatrième feuille depuis l'apex de la plante est prélevée, lavée puis séchée entre deux feuilles de papier absorbant. Un disque de papier stérile Whatman est déposé à l'intérieur d'une boîte de Petri, imbibé avec 3 ml d'eau stérile. Des disques de feuilles de 18 mm de diamètre (tests efficacité) ou des feuilles entières (analyse de l'expression de gènes) sont placés dans la boîte de Petri, face supérieure en contact avec le papier Whatman. Les sporanges des différentes souches de mildiou sont inoculés à l'aide d'une suspension de 5000 sporanges.ml⁻¹ (25 gouttes de 15 µl par feuille ou 3 gouttes de 15 µl par disque).

Une cellule de Malassez permet de contrôler le nombre de conidies et de sporanges contenus dans les suspensions déposées sur les feuilles.

2.2. Evaluation et comparaison des efficacités d'élicitation des défenses de la vigne

L'efficacité de stimulation des défenses de la vigne a été évaluée en conditions contrôlées et en conditions naturelles. Les méthodes d'évaluation des efficacités se situent à plusieurs niveaux :

- Au niveau biologique (inhibition de la croissance du pathogène) avec des tests d'efficacité selon deux méthodes standardisées (*in vitro* et *in vivo*),
- Au niveau moléculaire en suivant l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de défense par des analyses de PCR quantitative en temps réel.
- Au niveau biochimique par la quantification des phytoalexines produites par analyses chromatographiques liquide à haute performance (HPLC).

2.2.1. Evaluation de la croissance des agents pathogènes

Les évaluations de la croissance des agents pathogènes ont été réalisées après 12 jours de croissance pour l'oïdium et après 7 jours pour le mildiou à 22°C en utilisant une échelle visuelle de pourcentage de croissance (Figure 27).

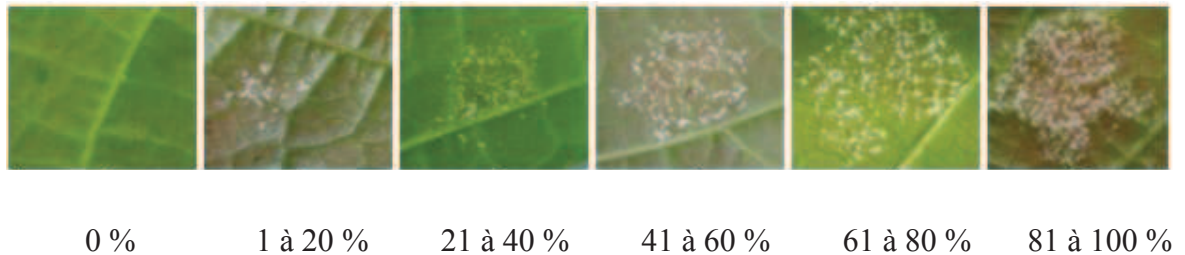


Figure 27 : Echelles de notation de croissance de *Plasmopara viticola* après 7 jours de culture.

2.2.1.1. Tests d'efficacité *in vitro*

Les tests d'évaluation de l'efficacité des stimulateurs des défenses de la vigne sont réalisés sur des disques de feuilles de 18 mm de diamètre avec 27 souches d'oïdium (15 souches appartenant au groupe génétique A et 12 souches de groupe B) et avec 13 souches de mildiou présentant des sensibilités variées à différents fongicides (Tableaux 11 et 12).

Trois produits (BTH, FOS et PK₂) ont été testés en tant qu'éliciteurs des défenses de la vigne sur la variété Cabernet-Sauvignon, et seul le BTH a été utilisé pour stimuler les défenses des génotypes de Colmar présentant des niveaux de résistances partielles contre le mildiou et l'oïdium. Les solutions de produits sont préparées extemporanément.

Pour l'oïdium, les applications sont effectuées en conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire. Les pulvérisations des produits sont effectuées avec un micro-diffuseur à réserve de pression (Ecospray®). Des contrôles sont réalisés en appliquant la même quantité d'eau distillée stérile sur des feuilles. Huit disques de feuilles sont pulvérisés avec les différentes concentrations de produits, puis séchés durant une heure.

Les différentes gammes de concentrations utilisées ont été les suivantes :

- BTH est appliqué à 0,47 - 1,18 - 2,36 - 3,54 - 4,72 et 7,08 mM, soit 100, 250, 500, 750, 1000 et 1500 mg. L⁻¹.

- FOS est appliqué à 0,28 - 0,70 - 1,40 - 2,11 - 2,81 et 4,21 mM, soit 100, 250, 500, 750, 1000 et 1500 mg. L⁻¹.

- PK₂ est appliqué à 0,63 - 1,59 - 3,18 - 4,78 - 6,37 et 9,55 mM, soit 100, 250, 500, 750, 1000 et 1500 mg. L⁻¹.

L'efficacité du traitement est déterminée par une évaluation visuelle du pourcentage de croissance des pathogènes sur les disques de feuilles après 12 jours de croissance pour l'oïdium et après 7 jours pour le mildiou à 22°C. Les résultats sont présentés comme le pourcentage moyen d'inhibition de la croissance du champignon par rapport à la modalité témoin, pulvérisée avec de l'eau stérile, obtenu par le calcul suivant :

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times \left(1 - \frac{\% \text{ croissance "traités"}}{\% \text{ croissance "témoins"}} \right)$$

À l'aide de représentations graphiques du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration du produit, une valeur correspondant à la dose inhibant à 50 % la croissance du champignon de 50% est déterminée (CI₅₀).

L'évaluation de l'efficacité des stimulations des défenses de la vigne est réalisée par la comparaison des valeurs de CI₅₀ qui sont inversement proportionnelles à l'efficacité des produits : plus les valeurs de CI₅₀ sont fortes, moins le produit a un effet et inversement, plus elles sont basses, plus le produit est efficace.

2.2.1.2. Tests de toxicité directe sur les pathogènes

L'oïdium et le mildiou sont des agents pathogènes obligatoires stricts, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent se multiplier en absence de leur plante hôte. L'efficacité des produits testés correspond en fait à un effet cumulé entre l'élicitation des défenses de la vigne et/ou un éventuel effet fongitoxique direct, qui ne peut pas être facilement dissociés dans le cas de ces pathosystèmes avec des agents biotrophes stricts. L'effet fongitoxique a pu être évalué sur la germination des sporanges de mildiou et sur le mycélium en croissance de l'oïdium.

a. P. viticola :

Des suspensions de sporanges sont préparées à 150 000 sporanges mL⁻¹ sont préparées dans des solutions concentrées d'éliciteurs :

- BTH de 0,47 à 4,72 mM (100, 250, 500 et 1000 mg. L⁻¹),
- FOS à 1.13 mM (400 mg. L⁻¹),
- PK2 à 0,63 et 6,33 mM (100 et 1000 mg. L⁻¹).
- Un contrôle négatif est réalisé avec de l'eau distillée et un contrôle positif avec un fongicide de référence (Champ® Flo à 100 mg. L⁻¹).

Les sporanges sont incubés une heure à 4°C pour empêcher la libération des zoospores. Une dilution au 1/10^{ème} est réalisée avant inoculation conduisant à une suspension à 15 000 sporanges mL⁻¹ dans 0,047 à 0,47 mM de BTH (10, 25, 50 et 100 mg. L⁻¹), 0,113 mM de FOS (40 mg. L⁻¹) et 0,063 et 0,633 mM de PK₂ (10 et 100 mg. L⁻¹).

L'évaluation de l'effet fongitoxique est effectué comme décrit précédemment par l'évaluation visuelle du pourcentage de croissance du pathogène et par évaluation de la sporulation après 8 jours d'incubation.

L'évaluation de la sporulation est réalisée par une méthode d'analyse d'image non destructive : des photographies numériques des disques de feuille sporulants après 8 jours de croissance ont été prises en conditions lumineuses naturelles. Les images numériques sont enregistrées sous format jpeg et traitées avec le logiciel d'analyse d'image ImageJ version 1.43q (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) comme décrit par Peressotti *et al*, (2011).

Dans un premier temps, les paramètres du logiciel sont ajustés et les deux premières étapes du procédé ont pour but d'homogénéiser toutes les images afin d'être analysées en optimisant les informations disponibles pour chaque image, les apportant tous au même niveau de qualité. Pour procéder à la quantification des pixels, l'image est convertie en format "8-bit". Puis le contraste du blanc correspondant à la sporulation est augmenté, la surface à mesurer est sélectionnée. Tous les pixels rouges contenus dans la surface sélectionnée sont ainsi comptés et le résultat apparaît automatiquement dans une nouvelle fenêtre.

b. E. necator

La pulvérisation de solutions élicitrices de BTH à 1,90 mM (400 mg. L⁻¹), FOS à 1,13 mM (400 mg. L⁻¹) et PK2 à 3,165 mM (500 mg. L⁻¹) est effectuée sur du mycélium en croissance (4 jours après inoculation) avec un micro-diffuseur Ecospray®. Un contrôle négatif est réalisé avec de l'eau distillée et un contrôle positif avec un fongicide de référence (Myclobutanil à 100 mg. L⁻¹). La toxicité directe des produits est évaluée par évaluation visuelle du pourcentage de croissance des pathogènes comme décrit précédemment 8 jours après traitement (soit 12 jours après inoculation) et l'évaluation de la sporulation est réalisée comme décrit précédemment pour le mildiou par la méthode d'analyse d'image non destructive mais également par la quantification des spores au compteur à particules (Beckman Coulter® Multisizer 3). Les disques sporulants sont déposés dans 15 ml d'Isoton (Coulter® Isoton II diluant) et une goutte de dispersant cationique (Coulter® dispersant type IIIA). Après une forte agitation, les disques sont retirés et les particules contenues dans 500 µl de solution sont comptées. Seules les particules comprises entre 18 et 37 µm sont retenues (correspondant à la taille attendue des spores d'oïdium).

2.2.1.3. Tests d'efficacité in natura

Les essais sont réalisés sur une parcelle expérimentale, constituée de répétitions de 4 blocs constitués de trois ceps de Cabernet Sauvignon non traités ou traités par pulvérisation à jet projeté à 1000 L/ha hebdomadairement (essais mildiou) ou par pulvérisation pneumatique à 100 L. ha⁻¹ (essais oïdium) selon les dispositifs décrits en annexes (Annexes 1 à 5). Différentes modalités ont été testées au cours des années 200 à 2011, employant soit des produits seuls, en mélange ou en alternance (Tableau 13). Les traitements ont débuté au stade phénologique 13-14 de l'échelle BBCH (Annexe 6, 3-4 feuilles étalées) soit les 5 mai 2009, 4 mai 2010 et 3 mai 2011 pour les essais mildiou et oïdium 2010 et le 19 avril 2011 pour l'essai oïdium 2011 car la précocité du développement de la vigne cette année nous a amené à avancer le protocole expérimental de 2 semaines. Tous les traitements ont cessé au stade 79 de l'échelle BBCH (fruits et baies ont atteint leur taille finale) soit les 21 juillet 2009 et 2010 et le 15 ou 19 juillet 2011), soit après 12 traitements (Figure 28 et Tableaux 13, 14 et 15).

Les données climatiques ont été également recueillies et analysées par « CLIMATIK », un outil stratégique de mise à disposition de données agro-climatiques de l'INRA, assurée à l'origine par le STEFCE puis maintenant AGROCLIM. (<https://intranet.inra.fr/climatik/do/climatik>).

a. Essais mildiou

Une inoculation artificielle a été réalisée au stade 55 BBCH (Annexe 6), 24 h après le quatrième traitement (les 27 mai 2009, 31 mai 2010 et 19 mai 2011), à raison de 6 feuilles par cep pulvérisé avec une solution concentrée de sporanges (25 000 à 45 000 sporanges /ml, Tableau 12 des souches mildiou).

Tableau 13 : Modalités appliquées au cours des expérimentations au vignoble en 2009, 2010 et 2011

Modalités	Fréquence Application	Mildiou			Oïdium	
		2009	2010	2011	2010	2011
1 - Témoin non traité		X	X	X	X	X
2 - 2 g. L ⁻¹ de matière active de BTH	7 j	X	X	X	X	X
3 - 2,5 g. L ⁻¹ de Fosétyl-aluminium	7 j	X	X	X	X	X
4 - 2,1 g. L ⁻¹ de mancozèbe (fongicide de référence)	7 j	X	X	X	X	X
5 - 2 g. L ⁻¹ de matière active de BTH	14 j		X	X		
6 - 2,1 g. L ⁻¹ de mancozèbe (fongicide de référence)	14 j		X	X		
7- 1 g. L ⁻¹ de matière active de BTH (demi dose)	7 j		X	X		
8- 1,05 g. L ⁻¹ de mancozèbe (fongicide de référence demi dose)	7 j		X	X		
9- 1 g. L ⁻¹ de matière active de BTH + 1,05 g. L ⁻¹ de mancozèbe	7 j		X	X		
10- 1g L ⁻¹ de matière active de BTH alterné avec 1,05 g. L ⁻¹ de mancozèbe.	7 j		X	X		
11- 1,25 g. L ⁻¹ de Fosétyl-aluminium (demi-dose)	7 j			X		
12- 1 g. L ⁻¹ de matière active de BTH + 1,25 g. L ⁻¹ de Fosétyl-aluminium	7 j			X		
13- 1 g. L ⁻¹ de matière active de BTH et la semaine suivante avec 1,25 g. L ⁻¹ de Fosétyl-aluminium	7 j			X		

Tableau 14: Calendrier récapitulatif des traitements et prélèvements réalisés dans les essais « Mildiou »

	Mildiou 2009	Mildiou 2010	Mildiou 2011
P1	04-mai	03-mai	03-mai
Début traitement	05-mai	04-mai	03-mai
P2	20-mai	27-mai	12-mai
P3	27-mai	31-mai	19-mai
Inoculation 1	27-mai	31-mai	19-mai
P4	29-mai	03-juin	21-mai
P5	24-juin	17-juin	16-juin
Inoculation 2	-	-	17-juin
P6	-	15-juil	18-juin
Dernier traitement	21-juil	21-juil	19-juil

En 2011, une seconde inoculation artificielle a été réalisée sur toutes les grappes par pulvérisation d'une suspension contenant 17 000 sporanges.mL⁻¹ pour ré-implanter l'épidémie peu développée en raison de conditions climatiques très défavorables (pas de pluie et très chaud).

Cinq à 6 prélèvements de feuilles choisies aléatoirement sont effectués au cours de la saison: avant le premier traitement, puis 48 h après les 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème}, 7^{ème} et 8^{ème} traitements et également 48 heures après l'inoculation artificielle (Tableaux 14 et 16 et Figure 28). Douze feuilles de stade similaire sont prélevées pour chaque modalité (1 feuille par cep) réparties en quatre lots de trois feuilles qui seront utilisés au laboratoire pour moitié, pour des analyses biochimiques et pour des analyses moléculaires.

L'évaluation du développement de la maladie au vignoble commence début juin, après 5, 6 ou 7 traitements et se prolonge de une à trois semaines après l'inoculation artificielle (le 4 juin en 2009, 2 juin en 2010 et le 9 juin en 2011). Le niveau d'attaque de 30 feuilles par bloc est évalué régulièrement et le niveau d'attaque de 50 grappes par bloc est évalué deux fois au cours de l'expérimentation (les 25 juin et 23 juillet 2009, 7 et 30 juillet 2010 puis 27 juin et 12 juillet 2011) soit 4 semaines et 9 semaines après l'inoculation artificielle (Figure 28).

Des traitements de couverture sont réalisés au cours de la saison pour protéger les essais mildiou contre des attaques d'oïdium à l'aide de Kérathane (Dinocap) ou de Corail (Tébuconazole) et des brumisations sont appliquées après l'inoculation ou au cours de la saison afin de maintenir un certain niveau d'humidité sur la parcelle d'essai permettant la propagation des zoospores de mildiou et la progression de l'épidémie (Figure 28).

Tableau 15 : Nombre de traitements effectués lors des différents prélèvements.

Prélèvements	Mildiou 2009	Mildiou 2010	Mildiou 2011	Oïdium 2010	Oïdium 2011
P1	0	0	0	0	0
P2	3	4	2	1	1
P3	4	4	3	3	4
P4	4	5	3	5	5
P5	8	7	7	7	8
P6	-	11	11	11	11

b. Essais oïdium

Une inoculation artificielle a été réalisée au stade 13 BBCH (Annexe 6, 6 mai 2010 et 21 avril 2011), 48 h après le premier traitement, à raison de 2 rameaux inoculés pour chaque cep central de chaque bloc, par dépôt aérien à l'aide de deux disques sporulants. Six prélèvements de feuilles sont effectués au cours de la saison (Figure 29, tableaux 14 et 15) : avant le premier traitement (4 mai), 24 heures après l'inoculation artificielle (7 mai en 2010 et 22 avril en 2011), puis 48 h après les 3^{ème} ou 4^{ème}, 5^{ème}, 7^{ème} ou 8^{ème} et 11^{ème} traitements (20 mai, 3, 17 juin et 15 juillet 2010 et 5, 19 mai, 9, 30 juin 2011), à raison de 12 feuilles par modalité choisies aléatoirement (1 feuille par cep) réparties en quatre lots de trois feuilles lesquels seront utilisés au laboratoire pour moitié, pour les analyses biochimiques et l'autre moitié pour les analyses moléculaires.

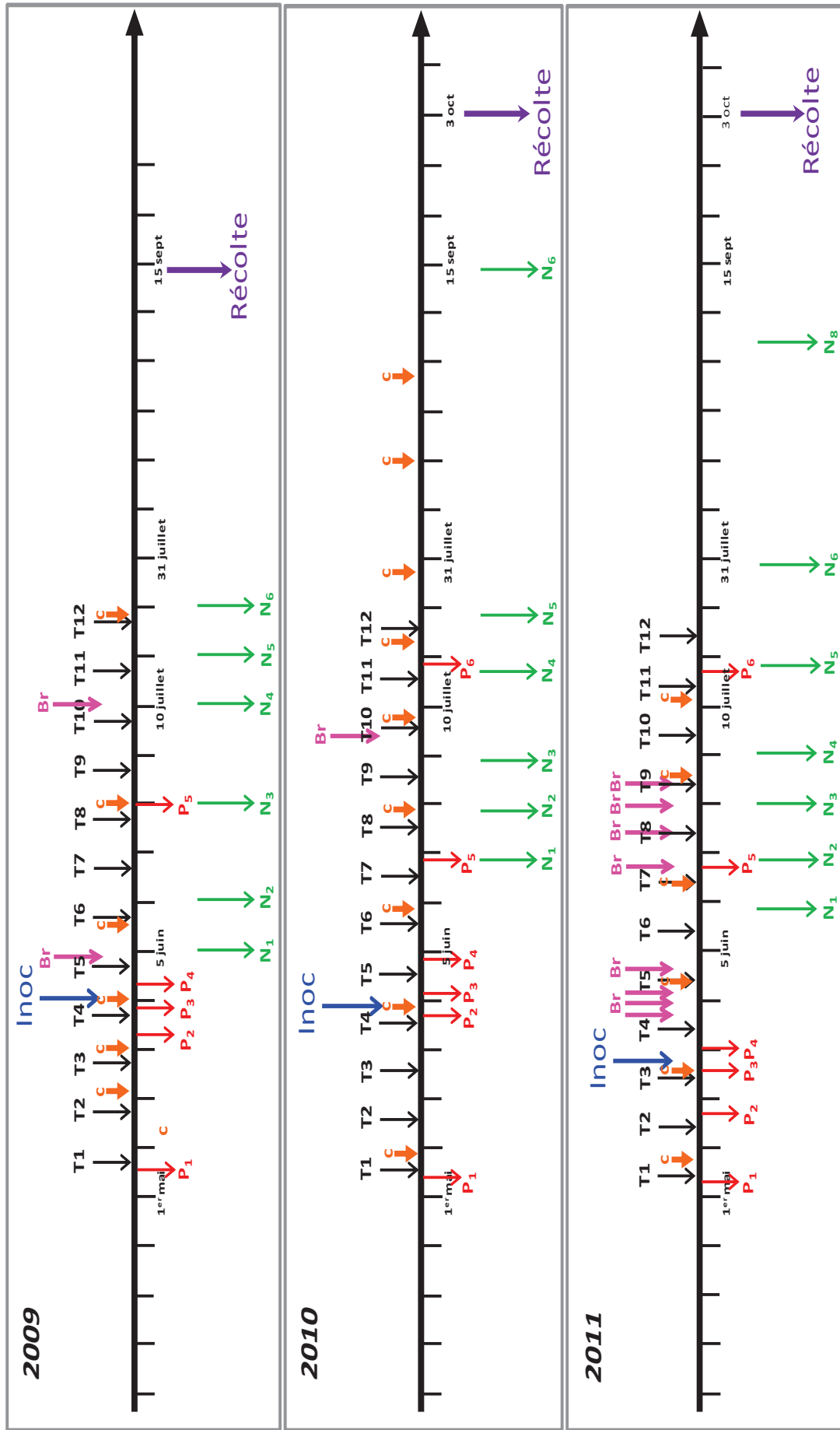


Figure 28 : Représentations schématiques des protocoles expérimentaux « Mildiou » mis en place au vignoble du domaine de Couhins en 2009 - 2010 et 2011: T_n : traitements produits; P_n : prélèvements de feuilles pour les analyses biochimiques et moléculaires ; N_n : notations des épidémies ; C : traitements de couverture ; Br : brumisations.

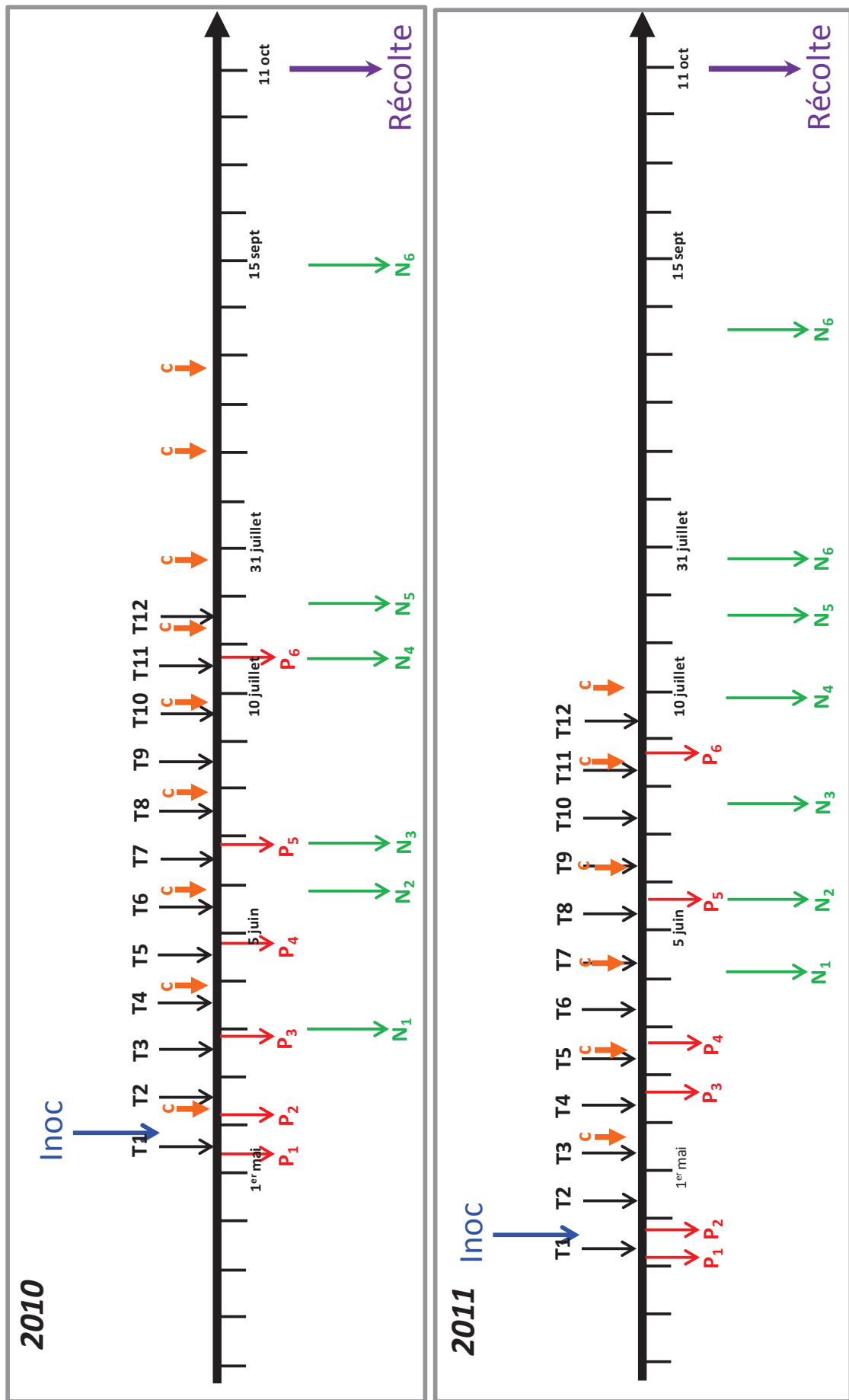


Figure 29 : Représentations schématiques des protocoles expérimentaux « Oïdium » mis en place au vignoble du domaine de Couhins en 2010 et 2011: T_n : traitements produits; P_n : prélèvements de feuilles pour les analyses biochimiques et moléculaires ; N_n : notations des épiphytes C : traitements de couverture.

Tableau 16 : Calendrier récapitulatif des traitements et prélèvements réalisés dans les essais « Oïdium »

	Oïdium 2010	Oïdium 2011
P1	03-mai	18-avr
Début traitement	04-mai	19-avr
Inoculation	06-mai	21-avr
P2	07-mai	22-avr
P3	20-mai	12-mai
P4	03-juin	19-mai
P5	17-juin	09-juin
P6	15-juil	30-juin
Dernier traitement	21-juil	05-juil

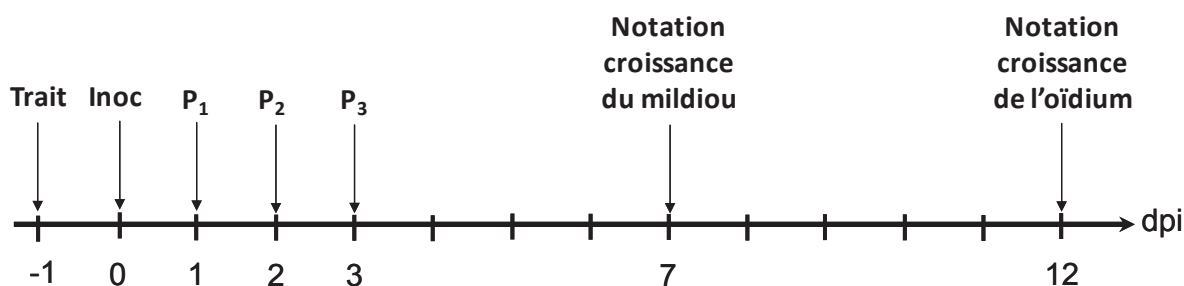


Figure 30 : Plan expérimental pour l'étude de l'expression des gènes *in vitro*.

(1) **Elicitation avec les produits** : eau distillée, BTH à 0,47 ou 1,90 mM, FOS à 1,13 mM et PK2 à 3,18 mM.

(2) **Inoculation des pathogènes**

(3) **Prélèvements des échantillons (P₁, P₂ et P₃)** : 6 feuilles par modalités 1, 2 et 3 jours après inoculation.

Modalités : témoin non traité non inoculé, témoin traité non inoculé, témoin traité inoculé et les différentes modalités traitées - inoculées ont été réalisées pour chaque souche de pathogène et pour chaque produit.

L'évaluation du développement de la maladie a commencé le 3 juin en 2010 et le 19 mai en 2011, après 5 traitements, soit 4 semaines après l'inoculation artificielle. Le niveau d'attaque de 30 feuilles par bloc est ainsi évalué visuellement hebdomadairement et le niveau d'attaque de 50 grappes par bloc a été évalué deux fois au cours de l'expérience, 9 et 12 semaines après l'inoculation artificielle (les 8 et 29 juillet en 2010 et les 15 juin et 4 juillet en 2011).

Des traitements de couverture sont réalisés au cours de la saison avec du Rémitline (46,5% mancozèbe et 4% de cymoxanil) pour protéger les essais oïdium contre des attaques de mildiou (Figure 29).

2.2.2. Analyses moléculaires

Pour l'étude de l'expression des gènes impliqués dans les réponses de défense de la vigne en conditions contrôlées, nous avons choisi d'utiliser un nouveau protocole expérimental en utilisant les doses suivantes : 0,47 et 1,90 mM de BTH, 1,13 mM de FOS et 3,18 mM de PK₂. Les traitements sont réalisés sur des feuilles entières, à raison de six feuilles par modalité. Des témoins traités avec de l'eau stérile sont également préparés. L'inoculation des pathogènes est effectuée 24 heures après le traitement avec les éliciteurs (Figure 30). Pour évaluer l'efficacité des produits, 6 feuilles sont conservées, sur lesquelles une mesure de la croissance du pathogène est effectuée soit 12 jours après l'inoculation pour l'oïdium, soit 7 jours après l'inoculation pour le mildiou. Le niveau d'inhibition est déterminé comme décrit précédemment (§ 2.2.1).

Pour l'étude de l'expression des gènes impliqués dans les réponses de défense de la vigne en conditions naturelles, les 4 lots de trois demi-feuilles sont extraits suivant le même protocole de prélèvements que ci-dessus (Tableaux 14 à 16 et Figures 28 et 29).

2.2.2.1. Extraction des ARNs et obtention des ADNc

L'extraction des ARNs est réalisée en accord avec le protocole décrit par (Reid, 2006 #360), à partir de 3 feuilles congelées dans de l'azote liquide, par modalité, conservées à -80°C. Après broyage dans l'azote liquide, la poudre de feuilles est ajoutée à un tampon d'extraction (20 mL g⁻¹) préchauffé à 65 °C (300 mM Tris HCl, pH 8,0 ; 25 mM EDTA ; 2 mM NaCl ; 2% CTAB ; 2% de poly-vinyl poly-pyrrolidone (PVPP) ; 0,05% de spermidine trihydrochloride et 2% β-mercaptoéthanol ajouté extemporanément). Le mélange est agité vigoureusement et incubé dans un bain marie à 65°C pendant une heure, sous agitation régulière. Un volume égal d'un mélange chloroforme: alcool isoamylique (24:2 ; v/v) est ajouté puis centrifugé à 3500 g pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube auquel 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et 0,6 volume d'isopropanol sont ajoutés. Les tubes sont agités et stockés à -80°C pendant 30 minutes. Le culot d'acides nucléiques est obtenu après une centrifugation à 3500 g (30 minutes à 4°C), dissout dans 1 ml de tampon Tris-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,5), puis transféré dans un tube Eppendorf de 2ml. Pour précipiter sélectivement les ARNs, 0,3 volume de LiCl 8 M est ajouté, puis l'échantillon est stocké une nuit à 4°C. Les ARNs précipités par centrifugation à 20000 g (30 minutes à 4°C) sont lavés avec de l'éthanol à 70% froid, séchés à l'air et dissouts dans 200 µl d'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC). Les quantités d'ARNs obtenus sont mesurées à 260 nm et 280 nm par spectrométrie (Genequant pro, Amersham Bioscience, France).

Tableau 17 : Liste des amorces dessinées et utilisées pour l'expression des gènes de défense de la vigne (Dufour *et al.*, 2011).

Référence	Gènes	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')	N° accession GeneBank	Références	
PR Protéines	Chaîne gamma du facteur d'élongation 1 (EF1γ)	GAAGTTGACCTCTCGGATG	AGAGCCTCTCCCTCAAAGG	AF176496	Pratelli <i>et al.</i> , 2002	
	PR protéines de classe I (PR1)	CCCAGAACTCTCCACAGGAC	GCAGCTACAGTGTCTTCCA	AJ536326	Bertsch <i>et al.</i> , 2003	
	PR protéines de classe 10 (PR10)	GCTCAAAGTGTGGCTTCTC	CTCTACATCGCCCTTGGTGT	AJ291705	Esnault <i>et al.</i> , 1993	
	Chitinase de classe III (CHIT3)	AATGATGCCAAAACGTAGC	ATAAGGCTCGAGCAAAGTCA	Z68123	Busam <i>et al.</i> , 1997	
	Chitinase de classe IV (CHIT4)	TATCCATGTGTCTCCGGTCA	GAATCCAAATGCTGTTTCCA	VVU97521	Robinson <i>et al.</i> ,	
	Protéine inhibant les polygalacturonases (PGIP)	CCGGAAAATCCCATATTCT	AAGGTCCAACGACGTCAAAC	AF305093	Bézier <i>et al.</i> , 2002	
	β-1,3 glucanase (GLU)	GGGGAGATGTGAGGGGTTAT	TGCAGTGAACAAAAGCGTAGG	AF239617	Aziz <i>et al.</i> , 2003	
	Inhibiteur de sérine protéase (PIN)	ACGAAAACGGCATCGTAATC	TCTTACTGGGACACCAATTC	AY156047	Aziz <i>et al.</i> , 2003	
	Phénylalanine ammonia lyase (PAL)	ACAACAATGGACTGCCATCA	CACCTTCGACATGGTTGGTG	X75967	Sparvoli <i>et al.</i> , 1994	
	Stilbène synthase (STS)	ATCGAAGATCACCCACCTTG	CTTAGCGGTTTGAAGGACAG	X76892	Sparvoli <i>et al.</i> , 1994	
	Chalcone isomérase (CHI)	AGAAGCCAAAAGCCATTGAGA	CCAAGGGGAGAAATGAGTGAA	X75963	Sparvoli <i>et al.</i> , 1994	
	Chalcone synthase (CHS)	CCAACAATGGTGTGACTTGC	CTCGGTCAATGTGCTCACTGT	X75969	Sparvoli <i>et al.</i> , 1994	
	Leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX)	TGGTGGGATGGAAGAGCTAC	CCCACCTGCCCTCATAGAAA	X75966	Sparvoli <i>et al.</i> , 1994	
	Anthocyanidine réductase (BAN)	CCTGCCTCCAAGACACTAGC	GGCCATCAGAGTAGGGATGA	BN000166	Tanner <i>et al.</i> , 2003	
Phénylprotonoïdes	Flavanone 3 hydroxylase (F3H)	TGACTCGCTCTTCAAAGCA	CACCTTGGGACGTTTCATCTT	X75965.1	Sparvoli <i>et al.</i> , 1994	
	Lipoxygénase (LOX)	GACAAGAAAGGACGAGCCTTG	CATAAGGGTACTGCCCGAAA	AY159556	Aziz <i>et al.</i> , 2003	
	Glutathione S- transférase (GST)	GGGATCTCAAAGGCCAAAACA	AAAAAGGCTTGGCGGAGTAAT	AY156048	Aziz <i>et al.</i> , 2003	
	Acide 1-aminocyclopropane, 1-carboxylique oxydase (ACC)	GAAGGCCTTTACGGGTCTC	CCAGCATCAGTGTGCTCT	AY211549	Chervin <i>et al.</i> , 2004	
	Antranilate Synthase (ANTS)	AAAAATCAAAGAGGGTGCT	AAGCTTCTCCGATGCACACTGT	XM 002281597	NCBI's Annotation Process	
	Chorismate Mutase (CHORM)	TCATTTAGAGGGCCAAAATTC	AGGAGGCAGAAAAAGCATCA	F1604854	NCBI GenBank *	
	Chorismate Synthase (CHORS)	GCCTTCACATGCAGATGCTA	CTGCAACTCTCCCAATGGTT	F1604855	NCBI GenBank **	
	Callose synthase (CALS)	TGGAAAATGCAATTCAAAACGA	CGAATGCCATGCTGTGATGG	AJ430780.1	Seibicke, T., 2002	
	Peroxydase (PER)	TAAGCGCCACAAGAACACTG	GGACCTCTTGTGTGAGTCCA	XM002274762.1	NCBI's Annotation Process	
	Coniferyl alcohol glucosyl transférase (CAGT)	TCGGAAGGGAATGCAATAAG	TCTFAGGAGGAACCCACCTTG	XM02273320.1	NCBI's Annotation Process	
	Indole					

* Zhang,Z.Z., Zhu,B.Q., Li,C.L., Duan,C.Q. and Pan,Q.H, NCBI submitted, unpublished, ** Zhu,Z.Z., Zhu,B.Q., Li,C.L., Duan,C.Q. and Pan,Q.H, NCBI submitted, unpublished.

Deux μg d'ARNs sont traités à la DNase (RQ1 Rnase-free Dnase, Promega, France) puis rétro-transcrits en utilisant 1,2 μM d'oligo d(T)₁₅ et de la reverse transcriptase M-MLV de Promega selon les recommandations du fabricant. Les ADNc obtenus sont ensuite stockés à $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.2.2. PCR quantitative en temps réel

Les amorces pour le gène de référence (EF1 γ) et les gènes étudiés (Tableau 17) utilisées pour la PCR quantitative en temps réel sont dessinées avec le logiciel Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). La température d'hybridation ($60\text{ }^\circ\text{C}$), la concentration de MgCl_2 (50 mM) ainsi que la taille des amorces (75 à 150 paires de base) sont fixées pour chaque dessein d'amorce. Pour assurer la normalisation correcte en temps réel PCR, l'efficacité d'amplification doit être semblable. Chaque système PCR a été évalué avec des échantillons d'ADNc qui ont été dilués en série dans des proportions 1:10 avec l'eau stérile. L'efficacité d'amplification est déterminée par la pente de la droite obtenue par la régression linéaire du logarithme de la concentration initiale de ADNc (variable indépendante) en abscisse et les valeurs de Cq (Cycle Quantification, représentant la valeur du nombre de cycle de qPCR à partir duquel le seuil de fluorescence devient significativement différent du bruit de fond = variable dépendante) mesurées par le logiciel CFX 96 (Bio-RAD, Hercules, CA, USA) en ordonnée (efficacité PCR = $10^{-1/\text{pente}} - 1$). Des courbes de dissociation pour chaque amplicon sont analysées pour vérifier leur spécificité.

Les réactions de qPCR sont dupliquées, sur un thermocycleur iCycler (Biorad France, Ivry sur Seine) programmé pour 40 cycles : 10 s à 95°C , 10 s à 55°C et 20 s à $72\text{ }^\circ\text{C}$, en utilisant un agent fluorescent, le SYBR Green pour détecter la synthèse de ADN double-brin (issu de l'amplification PCR), dans un volume final de 14 μL contenant 7 μL d'Absolute Blue qPCR SYBR[®] Green Fluorescein mix (ABGene, France), 1 μL de chaque amorce (sens et anti-sens, Tableau 17) à 10 μM et 5 μL de ADNc produits précédemment.

Pour chaque gène et pour chaque modalité, une valeur de Cq moyen est obtenue. Ensuite un ΔCq est déterminé pour chaque gène, pour chaque modalité comme étant la différence de Cq du gène étudié et le Cq du gène de référence (EF1 γ) : $\Delta\text{Cq} = \text{Cq}(\text{gène } x) - \text{Cq}(\text{EF1}\gamma)$.

L'expression relative d'un gène est obtenue par la formule suivante : $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}}$ ($\Delta\Delta\text{Cq}$ = différence entre les ΔCq de deux échantillons).

$\Delta\Delta\text{Cq} = [\text{Cq}(\text{gène } x) - \text{Cq}(\text{EF1}\gamma)]$ de l'échantillon traité - $[\text{Cq}(\text{gène } x) - \text{Cq}(\text{EF1}\gamma)]$ de l'échantillon témoin non traité.

Les valeurs d'expression relative comprises entre 0 et 1 correspondent à des répressions de gènes et subissent une transformation de variable en appliquant la formule suivante :

$[= -1/ \text{ER}]$ afin d'obtenir une même échelle entre les surexpressions et les répressions des gènes. Les résultats seront présentés sous forme de figures faisant apparaître les valeurs d'expressions relatives associées à un gradient de couleurs allant du bleu pour les gènes ayant une expression relative inférieure ou égale à -3 au rouge pour des expressions relatives supérieures ou égales à 3, en passant par le blanc pour les expressions relative égales à 1 (pas de modification d'expression, Figure 31).

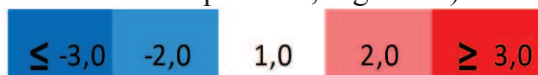


Figure 31: Echelle couleur appliquée aux résultats d'expression relative des gènes.

2.2.3. Analyses biochimiques

2.2.3.1. Préparation des échantillons

Les feuilles prélevées sont placées durant au moins une heure à -80°C puis lyophilisées pendant une nuit. Après lyophilisation, les feuilles sont réduites en poudre à l'aide d'un pilon, puis pesées afin de déterminer la quantité de la matière sèche. Chaque modalité étudiée est représentée par un lot de feuilles. Dans un erlen de 50 mL, 100 mg de matière sèche sont mélangés à 20 mL de méthanol 100%, et broyées à l'aide d'un Ultra broyeur (Ultra-turrax).

Les échantillons sont protégés de la lumière par un film de papier aluminium appliqué sur les erlens et placés une nuit à température ambiante. Une filtration sur coton de verre est effectuée le lendemain, afin de retenir le maximum de matériel solide. Puis trois rinçages successifs sont réalisés par le passage de 1 mL de méthanol 100%.

Le filtrat obtenu est réduit par évaporation sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (ou Rotavapor).

Le résidu sec obtenu est mis en suspension dans 2 ml de méthanol 30% puis déposé sur une colonne de silice de purification (Sep-pack C18). L'échantillon est élué avec 5 mL de méthanol à 90 %, l'éluat est réduit par évaporation sous pression réduite et repris dans 1 mL de méthanol 50 %. L'échantillon est filtré sur des membranes de nylon de porosité $0,45\ \mu\text{m}$ puis stockés à -20°C jusqu'à leur dosage.

2.2.3.2. Dosages HPLC

Le dosage des stilbènes (isomère *trans* du resvératrol et picéide) sont réalisés par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Une HPLC est constituée d'une phase mobile constituée de l'éluant A et B ainsi que d'une phase stationnaire représentée par une colonne ProntoSIL Eurobond C18 (filtre de $5\ \mu\text{m}$, Longueur 250 mm, Diamètre 4,0 mm). 100 μL d'échantillons sont injectés à l'aide d'un injecteur automatique Kontron instrument HPLC 360 autosampler boucle. Les conditions d'élution sont les suivantes :

- débit 1 mL/min,
- phase mobile A : eau/acide trifluoroacétique 1% (975/25, v/v),
- phase mobile B : 80 % acétonitrile/ 20% solvant A (80/20, v/v),
- gradient (Tableau 18).

La détection des stilbènes est réalisée à l'aide d'un détecteur à fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 300 nm et une longueur d'onde d'émission de 390 nm et à l'aide d'un détecteur UV multi-longueurs d'onde (barette d'iode DAD) à 220, 280 et 307 nm qui correspondent aux longueurs d'onde optimales pour les stilbènes.

Les teneurs en stilbènes des feuilles sont calculées par rapport à des courbes de référence réalisées avec des composés purs (picéide, resvératrol, ptérostilbène et viniférines) de 10 à 1000 ng par injection de 100 μL selon les formules suivantes (régression linéaire de l'aire des pics y fonction de la quantité injectée x) :

- Picéide : $y = 10^6x - 16212$
- Resvératrol : $y = 2.10^6x - 4632,4$
- Ptérostilbène : $y = 10^6x + 2192,5$
- ϵ viniférine : $y = 2.10^6x - 5104,5$

Tableau 18 : Gradients utilisés pour les analyses HPLC.

Temps (min)	Gradient 1 (% B)	Gradient 2 (% B)
0		10
5	20	20
19	25	25
20	30	30
35	40	40
50	40	40
55	60	60
56	100	100
60	100	100
62	20	10
72	20	10

○

2.2.4. Qualité et rendement de la récolte

Toutes les grappes de chaque bloc expérimental sont récoltées, comptées et pesées. Cela permet d'évaluer le nombre moyen de grappes produites par cep, ainsi que le poids moyen par grappe et le rendement. De plus, cent baies prélevées au hasard par modalité, sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse et pesées afin d'évaluer le poids moyen d'une baie.

Trois lots de 3 grappes par modalité sont écrasés pour obtenir du jus de raisin. Le pH est mesuré avec un pH-mètre, puis l'acidité est évaluée comme correspondant au volume de NaOH (0,1 N) nécessaire pour ajuster le pH à 7. Le taux de sucre contenu dans le moût est mesuré grâce à un réfractomètre Brix qui utilise certains principes optiques pour estimer la concentration d'une solution en sucre (un degré Brix représente 1% en poids de saccharose dans la solution).

2.3. Traitements statistiques

Pour évaluer l'efficacité de stimulation des défenses de la vigne et l'expression des gènes face à la diversité des pathogènes, toutes les données sont soumises soit à une analyse de covariance par modèle général linéaire (données d'efficacité) soit à une analyse de variance (données d'expression) en utilisant un programme d'analyse statistique Systat 11 (Systat Software, Inc) en utilisant les modalités « souches », « traitements » et « traitement + souches » comme variables indépendantes. Les différences significatives dans les valeurs moyennes sont déterminées au seuil de 0,05 et les comparaisons deux à deux sont effectuées par le test de Tukey.

Résultats

Partie I : Stimulation des défenses de *Vitis vinifera* cv. par le BTH et deux phosphonates : impact de la diversité génétique des pathogènes sur l'efficacité de stimulation.

1 Introduction

Vitis vinifera cultivée dans nos vignobles est une espèce de Vitacées très sensible à plusieurs maladies cryptogamiques d'importation comme le mildiou (*Plasmopara viticola*) et l'oïdium (*Erysiphe necator*). Les viticulteurs sont donc obligés de recourir massivement aux traitements fongicides avec les conséquences que l'on connaît : résistances aux fongicides, problèmes environnementaux.

Cependant, les plantes ont la capacité de se défendre contre les agents pathogènes en activant des mécanismes de défense, mais le succès de ces défenses dépend de la rapidité et de l'intensité de la réponse. Si l'activation des défenses est trop tardive, l'agent pathogène va coloniser les tissus végétaux. En présence d'un agent pathogène, la vigne peut déclencher ses mécanismes de défense, avec un succès variable selon le niveau de résistance intrinsèque d'une variété, suggérant une induction de défenses basales (Fung *et al.*, 2008). Une partie de ces défenses peuvent être induites et conférer une protection contre un large spectre d'agents pathogènes, soit autour du site de l'infection, soit de manière systémique (Walters *et al.*, 2007). Les connaissances et les outils disponibles pour étudier les mécanismes de défenses des plantes permettent aujourd'hui d'identifier plus précisément les réactions de défenses induites sur le modèle vigne et d'évaluer leur efficacité vis-à-vis de différents agents pathogènes.

L'élicitation des systèmes de défense induit généralement un réarrangement de flux métaboliques entre des voies constitutives exprimées et des voies inductibles. Liées au coût énergétique élevé de la biosynthèse des métabolites secondaires, les cellules des plantes ont élaboré des stratégies pour contrôler leur métabolisme. Cette régulation s'effectue principalement au niveau enzymatique et au niveau de l'expression de gènes. Une analyse quantitative du niveau d'expression de certains gènes devrait nous éclairer sur l'implication de certaines voies métaboliques. Ainsi, grâce à la transcriptomique, connaissons-nous aujourd'hui de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes de défenses de la vigne (Fung *et al.*, 2008 ; Hren *et al.*, 2009 et Pontin *et al.*, 2010).

Typiquement, ce système de résistance inductible peut être associée à l'accumulation d'acide salicylique (SA), nécessaire pour la transduction du signal dans le système de résistance systémique acquise (SAR) (Pieterse et Van Loon, 2007), conduisant à une expression coordonnée de protéines liées à la pathogenèse (PR), à la production de phytoalexines, et au renforcement des parois des cellules végétales (Garcion *et al.*, 2007).

Des études antérieures conduites au laboratoire (thèse J. Bouscaut, 2005) ont permis de choisir des éliciteurs potentiellement intéressants, de composition chimique définie, qui présentaient des efficacités stables et reproductibles contre les deux pathogènes majeurs de la vigne (l'oïdium et le mildiou) en conditions contrôlées. Notre intérêt s'est porté plus particulièrement sur les phosphonates et un benzothiadiazole : le BTH, déjà bien connus comme stimulateurs des défenses des plantes (Iriti *et al.*, 2004 et Daniel et Guest, 2006).

L'application exogène d'inducteurs qui imitent des composés naturels de signalisation comme l'acibenzolar-S-méthyle ou benzothiadiazole (BTH), a été démontré comme efficace contre un large spectre de pathogènes dans diverses plantes (Sticher *et al.*, 1997; Dann *et al.*, 1998 ; Tally *et al.*, 1999; Brisset *et al.*, 2000 ; Baysal *et al.*, 2003; Bressan *et al.*, 2005), sans aucune activité antifongique directe (Siegrist *et al.*, 1997). Aujourd'hui, la résistance systémique acquise (SAR) induite par le BTH a été clairement établie comme dépendante de la voie de l'acide salicylique (SA) (Friedrich *et al.*, 1996) et s'accompagne d'une surexpression significative de gènes de protéines PR (PR) (Lawton *et al.*, 1996; Brisset *et al.*, 2000 ; Bovie *et al.*, 2004 ; Hukkanen *et al.*, 2008), d'une accumulation de composés phénoliques (Iriti *et al.*, 2004), et de la modification d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme primaire (Verica *et al.*, 2004 ; Hukkanen *et al.*, 2008). Le BTH active le signal de transduction de la SAR en agissant sur des étapes qui se situent en amont ou au niveau de l'accumulation de SA indépendamment des voies de transduction de l'éthylène et du jasmonate (Ryals *et al.*, 1996).

Les phosphonates ou phosphites (H_2PO_3^-) est un terme générique utilisé pour les mono ou di-sels de potassium de l'acide phosphoreux (H_3PO_3). Ces produits sont largement commercialisés, soit comme source de nutrition de phosphore, soit en tant que fongicide pour lutter contre les oomycètes (Mc Donald *et al.*, 2001). Ils possèdent un mode d'action complexe, contre les champignons, impliquant à la fois des effets directs de type fongicide et indirects, avec une stimulation forte et rapide des mécanismes de défense des plantes (Smillie *et al.*, 1989 ; Guest et Grant, 1991 ; Jackson *et al.*, 2000 ; Hardy *et al.*, 2001 ; Daniel *et al.*, 2005).

Le fosétyl-aluminium, un dérivé phosphonate, est un fongicide systémique utilisé contre les maladies causées par des oomycètes, qui possède une mobilité et d'acropète et basipète et qui est hydrolysé dans la plante en ion phosphonate (Bompeix et Saindrenan, 1984 ; Fenn et Coffey, 1985, 1989). Il a fait l'objet de nombreux travaux sur son rôle comme inducteur de phytoalexines (Nemestothy et Guest, 1990 ; Jackson *et al.*, 2000 ; Hardy *et al.*, 2001 ; Daniel *et al.*, 2005). Suite à l'inhibition par les phosphonates de la croissance mycélienne, l'hypothèse selon laquelle le fosétyl-Al avait un effet direct sur les oomycètes a été confirmée. Puis une seconde hypothèse a été émise, sur un mode d'action indirecte. Les phosphonates seraient présents dans les plantes à des concentrations insuffisantes pour prévenir la croissance du mycélium et induiraient un stress physiologique chez l'agent pathogène, l'amenant à provoquer des réactions de défense de l'hôte (Guest, 1984 et 1989). Les phosphonates modifient divers métabolismes dont la réponse respiratoire et la stimulation des défenses cytoplasmiques et la production de phytoalexines de la plante hôte (Bompeix *et al.*, 1981 ; Guest, 1986; Saindrenan *et al.*, 1988 et 1990).

Le PK₂, un fertilisant, appartient aussi à la famille des phosphonates. Ce fertilisant foliaire semble présenter également une action de stimulateur des défenses naturelles de la vigne. En effet, des plants traités avec ce produit suggèrent l'existence de stimulation des défenses : une présence précoce d'éthylène (indication de stress), une accumulation précoce de lignine et de phytoalexines autour du site d'infection (Soyez, 2001 #218). Il semble que tous les phosphonates (H_2PO_3^-) possèdent ce potentiel de stimulation de défenses des plantes, et qu'ils soient immédiatement disponibles pour la mise en alerte des systèmes de défense de la plante.

Cependant il n'existe pas de données sur l'efficacité de ces produits face à la variabilité des agents pathogènes de la vigne stricts de la vigne et leur comportement. Les quelques recherches à ce jour tendent à se concentrer sur l'efficacité directe au vignoble, plutôt que sur l'explication de la variabilité des réponses obtenues avec ces composés.

Les travaux de cette partie s'attachent à répondre aux quatre questions suivantes :

- Peut-on stimuler les mécanismes de défense d'une variété de vigne dite sensible (Cabernet Sauvignon) pour lutter simultanément contre le mildiou et l'oïdium ? Et avec quel éliciteur ?

- Est-ce que la diversité phénotypique et génotypique des agents pathogènes influencent l'efficacité des défenses et les mécanismes mis en œuvre ?

- Est-ce que les mécanismes de défense induits par les différents produits empruntent les mêmes voies métaboliques ?

- Peut-on trouver des biomarqueurs (moléculaires ou biochimiques) qui nous renseigneraient sur le statut de défense de la plante face aux bioagresseurs ?

2. Résultats

Les résultats obtenus dans cette partie seront présentés sous forme de 4 publications:

2.1. Sensitivity of biotrophic pathogens of grapevine (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*) to acibenzolar-S methyl and two phosphonates (soumise à Pest Management Science, novembre 2011).

2.2. Benzothiadiazole-primed defense responses and enhanced differential expression of defense genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*). (soumise à Plant Pathology, 29 octobre 2011, N°PP-11-392).

2.3. Fosetyl-Aluminium enhances disease resistance against powdery and downy mildew in grapevine (en preparation pour soumission dans Pest Management Science)

2.4. A fertilizer with potassium-phosphonate elicits disease resistance against powdery and downy mildew in grapevine (en preparation pour soumission dans Journal of Agricultural and Food Chemistry)

2.1. Sensitivity of biotrophic pathogens of grapevine (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*) to acibenzolar-S methyl and two phosphonates (soumis à Pest Management Science).

M. C. Dufour and M. F. Corio-Costet*

INRA, UMR Santé Végétale (1065), ISVV, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon, France.

Running title: Sensitivity of *E. necator* and *P. viticola* to grapevine defence stimulators.

Keywords: Acibenzolar-S-methyl, Phosphonate, Fosetyl-Aluminium, *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola*, mycelia growth.

Soumise à Pest Management Science en Novembre 2011

Abstract

BACKGROUND: The antifungal properties of two phosphonates (FOS, PK₂) and acibenzolar-*S*-methyl (ASM) were evaluated to assess their potential for protecting grapevine leaves against grapevine mildews (*Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*), and to determine their effects on the development of various mildew isolates, taking into account the inter and intra species variability of pathogens.

RESULTS: The phosphonates directly and significantly inhibited the growth of these pathogens. By contrast, ASM had no direct effect on spore production and growth of *P. viticola* and of *E. necator* at 1.9 mM. Applied before inoculation, the mean EC₅₀ of ASM was 0.50 ± 0.04mM and 1.00 ± 0.07 mM for downy and powdery mildew isolates, respectively. The EC₅₀ of the fosetyl-aluminium (FOS) was 0.50 ± 0.0 mM for downy mildew and the EC₅₀ for powdery mildew varied depending on the genetic group under consideration (0.89 ± 0.32 mM for group B 3.30 ± 0.46 mM for group A, respectively). The EC₅₀ of the potassium phosphonate (PK₂) was 0.96 ± 0.45 mM for downy and 6.9 ± 0.76 mM for powdery mildew isolates.

CONCLUSIONS: These compounds showed differences in their efficacy depending on the variability of mildews and could be an alternative or additional method to traditional pest management in the grapevine.

Keywords: Acibenzolar-*S*-methyl, Phosphonate, Fosetyl-Aluminium, *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola*, mycelia growth.

1 INTRODUCTION

Vineyards are subject to numerous parasitic pressures, among which obligate parasites such as powdery mildew (*Erysiphe necator* Schw.) and downy mildew (*Plasmopara viticola* Berk. & Curt) are very important grapevine diseases (*Vitis vinifera*). These two biotrophic pathogens, native to the United States, infect green vine tissues and cause significant economic loss as well as environmental damage through the repetitive application of fungicides.

The biotrophic oomycete *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.), the causal agent of downy mildew, is a heterothallic endoparasite.¹ Its development involves intercellular mycelial growth and the differentiation of haustoria, which penetrate parenchyma cells. The genetic diversity of this oomycete in Europe is low, but the population exhibits various phenotypes and genotypes (e.g. fungicide resistance).²⁻³ By contrast, *Erysiphe necator* (grapevine powdery mildew) is an ascomycete, and an ectoparasitic biotrophic fungus. Its populations are divided into two distinct genetic groups, A and B, in Europe and Australia,⁴⁻⁵ that have different ecological requirements,⁶⁻⁷ but the distribution and the epidemiological significance of the two groups are unknown. Furthermore, group A isolates are significantly more sensitive to various fungicides than group B.⁸⁻⁹

To prevent fungal diseases on leaves and berries numerous fungicides treatments were required (from two to ten), having consequences on environmental and human health. Furthermore, the strong selection pressure sometimes applied by uni-site fungicides on pathogens such as downy and powdery mildew can result in the recurring appearance of resistant populations and this has limited the success of fungicides on grapevines (e.g. QoI or DMI fungicides).⁹⁻¹² As plants possess the ability to defend themselves against pathogens, part of these defenses can be induced this will confer protection against a wide spectrum of pathogens.¹³ It would be interesting to integrate these properties of plant defense into future pest management strategies. Typically, this resistance can be induced by biological or chemical agents¹⁴ leading to a coordinated accumulation of pathogenesis-related proteins (PR), to production of phytoalexins, and to the reinforcement of plant cell walls.¹⁵ To improve grapevine pest management, it is becoming increasingly difficult to ignore plant defence stimulators which could represent an important component of additional methods of pest management strategies for *E. necator* and *P. viticola*. Because they usually act on the plant and not directly on the pathogen,¹⁶ elicitors trigger a resistance phenomenon in the host plant

which could be more difficult for the pathogen to get round than the toxic effect of a uni-site fungicide.

The acibenzolar-S-methyl (ASM), a functional analogue of salicylic acid, is described as activating systemic resistance (SAR)¹⁷ and has been shown to be effective against a broad spectrum of pathogens in various plants.¹⁷⁻²² The effect of ASM on plants led to subsequent regulation of genes involved in primary and secondary metabolism, but also to an accumulation of phenolic compounds.^{19,23-26}

Phosphonates or phosphites (H_2PO_3^-), a generic term used for mono or di-potassium salts of phosphoric acid (H_3PO_3), are being widely marketed either as a source of plant nutrition or as a fungicide to control oomycetes.²⁷ The effect of phosphonates in controlling the pathogen is determined by the phosphonate concentration and when phosphonate concentrations were low, the product interacted with the pathogen at the site of ingress to stimulate host defense enzymes.²⁸ Their mode of action is complex and may directly or indirectly inhibit the pathogen by activating plant defenses mechanisms.²⁹⁻³³ Fosetyl-aluminum, a phosphonate derivative, is a systemic fungicide which has acropetal and basipetal mobility and is active against oomycetes.³⁴⁻³⁵ Besides its fungicide activity, fosetyl-Al is also described as activating disease resistance mechanisms, such as phytoalexin production in plants.³⁶⁻³⁸ In the grapevine, it was more efficient in the post-infection period than in the pre-infection period and defenses of grapevine were activated only in the presence of *P. viticola*.³⁹ Other phosphonates, e.g. potassium phosphonate PK_2 , used as fertilizers also seemed to present an action of stimulating the natural defenses of the grapevine.⁴⁰ Indeed, crops treated with this product suggested the existence of defense stimulation with a premature presence of ethylen, a premature accumulation of lignin and phytoalexins around the site of infection. It seems that all phosphonates are able to stimulate plant defenses.

However there is no data on the efficacy of these products faced with the variability of grapevine obligate pathogens and their behavior. The few studies have tended to focus on direct efficacy in the vineyard rather than on an explanation of the variability of responses obtained with these compounds.

The aim of the present study was to investigate and compare the efficacies of ASM and phosphonates on various isolates of the two major grapevine pathogens. The overall objectives were (i) to assess the effect of two phosphites (FOS and PK_2) and acibenzolar-S-methyl on the development of *P. viticola* and *E. necator*, and (ii) to examine the role of pathogen diversity on their efficacy in order to optimize future applications in the vineyard. The utilization of phosphites or ASM could be considered as a possible strategy to be

included in an integrated pest management program in order to reduce the intensive use of fungicides and the phenomenon of fungicide resistance.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

Grapevine plants (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) were propagated in a greenhouse at 25°C with a 15:9h light: dark photoperiod. Two-month-old plants were used for the experiments, and the third and fourth leaves at the apex of plants were used for powdery mildew and downy mildew inoculations, respectively.

For powdery mildew experiments, whole adaxial surfaces of leaves were disinfected by immersion (10 min) in a solution of 5 % calcium hypochlorite solution (50g L⁻¹), rinsed and dried between two sheets of sterilised filter paper. Leaf discs were obtained with a pastry-cutter 18 mm in diameter and were placed in Petri dishes containing agar (20 g L⁻¹) supplemented with benzimidazole (30 mg L⁻¹) or on Whatman's paper moistened with 2.5 ml of sterile water.

For downy mildew experiments, whole abaxial surfaces of leaves were washed, dried between two sheets of sterilised filter paper and 18 mm-wide leaf discs obtained with a pastry-cutter were placed in Petri dishes on Whatman's paper moistened with 2.5 ml of sterile water.

2.2 Fungal materials

2.2.1 *Plasmopara viticola*

Two fungicide- sensitive isolates and four fungicide- resistant isolates from the laboratory monospore collection were used, multiplied on grapevine leaves and inoculated according to the procedure used by Corio-Costet *et al.*,¹¹ (Table 1), with spore suspension at 5000 sporangia ml⁻¹, twenty drops of 15 µl per leaf or three drops per leaf disc, and placed in a growth chamber (mean temperature 22°C, with 16h day⁻¹ light, 350 µm m⁻² s⁻¹) for 7 days.

2.2.2 *Erysiphe necator*

Powdery mildew isolates (8) belonging to genetic group B, and 10 belonging to genetic group A), used in the assays came from the laboratory collection (Table 1). Monoconidial isolates were inoculated under sterile conditions on decontaminated grape leaves (cv. Cabernet Sauvignon) in Petri dishes as described in a previous article.⁴¹ Leaves or leaf discs were placed at the bottom of a Plexiglas settling tower and conidia were blown in at the top from

sporulating leaves (1000-1500 conidia per cm² of leaf). Inoculated leaves or discs were placed in a growth chamber (mean temperature 22°C, with 16h day⁻¹ light, 350 µm m⁻² s⁻¹) for 12 days.

2.3 Effect of ASM and phosphonate concentrations on pathogen growth

The solutions of products were prepared extemporaneously for the experiments. ASM (S-methyl benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioate, Bion®, 50WG, Syngenta), Fosetyl-aluminium (aluminium tris (ethyl phosphonate), Aliette®) and a potassium phosphonate (PK₂, Proval) were dissolved in water. The effect of products on the mycelial growth of *E. necator* and *P. viticola* was assessed *in vitro*, using six different concentrations of ASM, FOS and PK₂ (100, 250, 500, 750, 1000 and 1500 mg L⁻¹ of a.i.). ASM was so applied at 0.47, 1.18, 2.36, 3.54, 4.72 and 7.08 mM, FOS at 0.28, 0.70, 1.40, 2.11, 2.81 and 4.21 mM and PK₂ at 0.63, 1.59, 3.18, 4.78, 6.37 and 9.55 mM.

The tests were carried out by spraying dilutions with a micro-diffuser having a pressure reserve (Ecospray ®) on eight leaf discs as described in detail previously, 1 hour before inoculation of pathogens.⁴²⁻⁴³ Controls were carried out by applying an equal quantity of sterile water onto leaf discs. Four independent experiments were done with various isolates of powdery mildew and three with various isolates of downy mildew. Inoculations were carried out as described above with a *P. viticola* spore suspension at 5000 sporangia ml⁻¹ (three drops of 15 µl per leaf disc), or under sterile conditions by blowing spores of *E. necator* from sporulating leaves (1000 conidia per cm² of leaf). Inoculated leaf discs were incubated for 7 and 12 days respectively as described above. Disease intensity was estimated by measuring growth and intensity of fungal mycelium and sporulation, as described previously,^{11,42} and was expressed as the mean ± standard deviation. Dose-response curves for pathogens were used to determine EC₅₀ (effective concentration inhibiting growth at 50%) as described previously.⁴⁴

2.4 Evaluation of direct toxicity on *P. viticola* and *E. necator*

2.4.1 Direct toxicity on *P. viticola*

Sporangia suspensions were prepared at 150 000 sporangia mL⁻¹ in product solutions : ASM from 0.47 to 4.72 mM (100, 250, 500 and 1000 mg L⁻¹), FOS at 1.13 mM (400 mg L⁻¹), PK₂ at 0.63 and 6.37 mM (100 and 1000 mg L⁻¹). A negative control was carried out with water and a positive control with a fungicide (Copper Hydroxyde, Champ Flo® at 100 mg L⁻¹). Sporangia suspensions were incubated 1 hour at 4°C and diluted at 1/10 before inoculation by

drops of 15 μl , leading to a suspension at 15 000 sporangia mL^{-1} in 0.047 to 0.472 mM of ASM, 0.113 mM of FOS and 0.063 to 0.367 mM of PK₂.

Assessment of toxicity was made as described above, by visual evaluation of the percentage of growth and by assessment of spore production after 8 days incubation. The quantification of spore production was conducted using a non-destructive for analysis of images where digital photos of sporulated leaf discs after 8 days growth were taken in natural light conditions. The images registered in JPEG format were treated with the image analysis software ImageJ version 1.43q (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) as described by Peressotti *et al.*⁴⁵

2.5.2 Direct toxicity on *E. necator*

One mL dish^{-1} of each ASM, FOS and PK₂ solutions was sprayed with a micro-diffuser under sterile conditions onto the upper surface of leaf discs four days after *E. necator* inoculations. Discs were incubated at 22°C in a growth chamber as described above. Controls with sterile water or with a reference fungicide (Myclobutanil at 100 mg L^{-1}) were carried out. Direct toxicity was assessed by visual evaluation of the percentage of growth as described above, 8 days after treatment (namely 12 days after inoculation).

Spore production was assessed for powdery mildew with a particule counter (Coulter Counter® MultisizerTM 3; Beckman Coulter, Paris-Nord, France). Sporulating discs were placed in vials filled with 15 mL isoton (Beckman Coulter® *Isoton II diluant*), one drop of non-ionic dispersant (Nacconol 90F, Dispersant Type IIIA; Beckman Coulter) and shaken. Spore production was thus assessed by counting the number of particles with diameters between 18 and 37 μm in a sample of 500 μL .

2.6 Statistical analyses

Three or four independent experiments of eight replicates were performed with the different isolates. Dose-response curves for pathogens were used to determine EC₅₀ (effective concentration inhibiting growth at 50%) as described in Sombardier *et al.*, 2011.⁴⁴ All data were subjected to an analysis of covariance by general linear model using the statistical programme Systat 11 (Systat Software, Inc) and significant differences were determined by Tuckey's honest significant difference (HSD) test at level of $P \leq 0.05$.

3 RESULTS

3.1 Effect of acibenzolar-S-methyl concentrations on *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*

The ASM concentration range was efficient against growth of monospore isolates of powdery (18) and downy mildews (6) (Table 1) exhibiting different phenotypes and genotypes and led to 90 to 100 % growth inhibition (Fig. 1). Growth of *P. viticola* and *E. necator* isolates were progressively inhibited by increasing the ASM concentration from 0.47 to 7.08 mM (100 to 1500 mg L⁻¹). The EC₅₀ values of ASM were 0.47± 0.06 and 0.53 ± 0.13 mM for the two groups of downy mildew, resistant (*Pv*-R) or sensitive (*Pv*-S) to fungicides, respectively. The EC₅₀ were 1.05± 0.28 mM and 0.95± 0.10 mM for the two genetic groups A (*En*-A) and B (*En*-B) of *E. necator*. ASM treatment was significantly more efficient against *P. viticola* than *E. necator* at low concentration (~ 0.5 mM) ($P= 0.041$, Figure 1). Despite the EC₅₀ difference, no significant difference concerning ASM efficacy on the various pathogens was observed ($P=0,917$).

No direct significant effect on *E. necator* growth and spore production ($P= 0.834$, Figures 2, 3) at 1.90 mM of ASM was observed. Concerning *P. viticola* ASM also had no significant effect on spore production and mycelial growth ($P=0.420$) (Figures 2-4) at 1.90 mM, a concentration corresponding to ~ EC₈₀ when the treatment with BTH was applied before inoculation (Figure 1).

3.2 Effect of Fosetyl-Al concentrations on *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*

Throughout this study 6 isolates of *P. viticola* and 18 isolates of *E. necator* were tested independently at least three times to evaluate the EC₅₀. Over-all, as expected, fosetyl was more effective against *P. viticola* than against *E. necator* (Figure 5). The EC₅₀ values ranged from 0.48 ± 0.07 to 0.52 ± 0.04 mM, respectively for the fungicide- sensitive isolates and for the fungicide- resistant isolates of *P. viticola*, with no significant difference ($P = 0.261$). Most surprising was the sensitivity to fosetyl of the two genetic groups of *E. necator* that was significantly different ($P=0.000$). It is apparent that the EC₅₀ value was higher (3.30 ± 0.46 mM) for the isolates belonging to genetic group A compared to the EC₅₀ value of the isolates belonging to genetic group B (0.89 ± 0.32 mM). Fosetyl-Al was more efficient (3.70 fold more) against genetic group B of *E. necator* than against group A isolates. The EC₅₀ of group B isolates of *E. necator* was not significantly different from the EC₅₀ of the two groups of *P. viticola*.

Strong evidence of the direct fosetyl-Al effect on *E. necator* was found with a significant decrease in the spore production of 38.7 % ($P=0.007$), compared to the reference fungicide myclobutanil which led to 97.3 % inhibition (Figure 3). The incubation of sporangia of *P. viticola* in fosetyl at a concentration of 1.13 mM (500 mg L⁻¹) induced an inhibition of 87.5 % of downy mildew (Figure 4). Fosetyl had a direct effect on the production of sporangia and /or mycelial growth.

3.3 Effect of fertilizer PK₂ concentrations on *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*

It is apparent from Figure 6 that the application of various concentrations of PK₂ to the different isolates led to a growth inhibition of 100 % for downy mildew isolates and only to 65 % for powdery mildew isolates (Figure 6). The EC₅₀ values obtained for the fungicide-sensitive and resistant isolates of downy mildew, respectively, are not significantly different (0.64 ± 0.22 and 1.27 ± 0.08 mM, respectively, $P=0.224$). However, at lower concentrations of PK₂ (e.g. 0.63 mM) applied on the two groups, the efficacy tended to be better against fungicide-resistant isolates than against fungicide-sensitive isolates of *P. viticola*. Concerning the EC₅₀ obtained on groups B and A of *E. necator*, no significant difference was observed (6.36 ± 1.53 and 7.44 ± 1.38 mM, respectively, $P=0.247$) (Table 2). Nevertheless, PK₂ was significantly more effective ($P=0.000$) against *E. necator* than against *P. viticola* isolates.

PK₂ had a significant direct effect on *E. necator*, leading to complete inhibition of spore production (100 %), whereas the reference fungicide, myclobutanil, led to 97.3 % inhibition (Figure 3). Two concentrations of PK₂ were tested on *P. viticola* sporangia, and the incubation of sporangia in solution at 0.63 mM of PK₂ (100 mg L⁻¹) had no effect on development of *P. viticola*, but at 6.37 mM (1000 mg L⁻¹), PK₂ induced a 70.9 % inhibition of downy mildew growth.

4 DISCUSSION

The purpose of the current study was to determine the sensitivity of various isolates of grapevine mildews (*P. viticola* and *E. necator*) exhibiting different genotypic and/or phenotypic characteristics to compounds potentially stimulating plant defenses such as ASM or phosphonates. Amongst the phosphonates, one was used as a fertilizer (PK₂) and the second as a fungicide against oomycetes (FOS). They are also described as inducers of acquired systematic resistance to oomycetes,³²⁻³⁷ as is ASM which is also a plant stimulator.¹⁷⁻

²³ One of the more significant findings to emerge from this study was that, depending on the

mildew species, or on the genetic group intra-species under consideration, the efficacy of the treatments on grapevine leaves led to very different results. The use of these products showed that, even belonging to the same chemical family (e.g. phosphonates), different efficacies were obtained. The relevance of this was clearly supported by the difference in sensitivity of the two genetic groups of *E. necator* to fosetyl and to PK₂. Indeed, although PK₂ showed similar efficacy on the two populations of *E. necator*, fosetyl, at concentrations included between 0.5 to 3 mM, exhibited greater efficacy on the isolates belonging to group B, not significantly different from that observed for the downy mildew isolates. The present study suggested that spraying phosphonates, or acibenzolar-*S*-methyl, on grapevine leaves before inoculation, was effective in reducing powdery and downy mildew development, and that pathogen growth progressively decreased in relation to the increase in compound concentrations. Nevertheless, over-all downy mildew isolates were more sensitive to phosphonates and acibenzolar-*S*-methyl than powdery mildew isolates. The comparison of the EC₅₀ values obtained tended to show that the three products exhibited better efficacy against downy mildew isolates than against powdery mildew isolates (Table 2). However, significant differences between ASM and phosphonate efficacies were found. ASM protected grapevine leaves effectively whatever the pathogen, whereas the phosphonates exhibited a significantly better efficacy against *P. viticola* populations.

As mentioned in the literature,¹⁶ no direct effect of ASM on *P. viticola* and *E. necator* was observed on mycelial growth and spore production, contrary to the ASM effect observed on *B. cinerea* at high concentrations (1 to 3 g L⁻¹).⁴⁶ By contrast, fungitoxicity was obtained after use of phosphonates on *P. viticola*, but also on *E. necator*. The efficacy against *E. necator* did not support the paper by Speiser *et al.*,⁴⁷ who wrote that potassium phosphonate was effective against downy mildew, but not against powdery mildew. On the other hand phosphonates are known to inhibit spore formation and germination in oomycetes species.^{30,48-49} In our experiment, the mean EC₅₀ of fosetyl was 177 mg L⁻¹ (0.5 mM) and the direct action on *P. viticola* at 400 mg L⁻¹ (1.13 mM) one hour before dilution (40 mg L⁻¹, 0.11 mM) and release on the encystment of zoospores, could be consistent with the effects of fosetyl on various *Phytophthora* species (*capsici*, *citrophora* and *parasitica*) as described by Matheron *et al.*⁵⁰ where, depending on the fosetyl concentration, the phosphonate inhibited spore formation (3 to 12 mg L⁻¹), mycelial growth (30 to 103 mg L⁻¹) or motility and germination of zoospores (300 to 1000 mg L⁻¹). It seemed that FOS and PK₂ reduced sporangia mobility and/or zoospore release. After one hour of incubation in phosphonate solutions at 1.13 mM and 6.37 mM, respectively, the solutions of sporangia were diluted 10 times before the drop deposits of

P. viticola sporangia which were in the presence of 0.13 and 0.63 mM of phosphonates up to the encystment of zoospores. Finally, eight days later, we observed a sporulation inhibition of 87.5 and 72% for FOS and PK₂, respectively, with PK₂ being less effective than fosetyl-Al on *P. viticola*. The present study also provides additional evidence with respect to the direct effect of phosphonates on powdery mildew spore production, with fosetyl-Al and PK₂ exhibiting a significant effect on spore production (38.7 and 100 % inhibition). The current investigations on growth and sporulation were limited by the obligate nature of the pathogens and we were only able to examine indirectly the effect of products on plant infection by *E. necator*. Powdery mildew and downy mildew are obligate pathogens that can only multiply on their plant host. The efficiency of the tested products corresponds in fact to a cumulated effect between a possible direct toxic effect on the fungi and/or the defence elicitation of the grapevine, which could not easily be separated from one another in the case of these strict obligate parasites.

Concerning the effect of ASM, our study once again reinforced the fact that ASM acts on the elicitation of plant defences. Indeed, no significant difference was found on growth and on spore production in our experimental conditions when ASM was applied on *P. viticola* or on *E. necator*. The mechanisms of ASM-induced plant resistance have been shown to involve the activation of SAR mechanisms based on the salicylic acid (SA) pathway^{17,23} with subsequent up-regulation of defence genes and an accumulation of phenolic compounds.²⁵ Recently, we deciphered the effect of ASM on grapevine defenses and we found that, after ASM treatment, grapevine protection was clearly related to the induction of PR-protein genes (*e.g.* *PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR-10*, *PR-8* and *PR-6*), to the over-expression of genes repressed by *P. viticola* and *E. necator* in infected leaves, and to the production of pterostilbene⁵¹ according to studies carried out on different plant-pathogen systems.^{19,21,24,26} The protective effect of acibenzolar-*S*-methyl on the development of *Rhizoctonia solani* disease in rice was noticeable if it was applied to leaves 24 hours before inoculation.⁵¹ Our study provided evidence that ASM and phosphonates applied one hour before pathogen inoculations induced efficient grapevine protection against downy and powdery mildew, and that this time lapse was sufficient. Further work needs to be done to establish whether plant stimulators should be applied in preventive application and to look at their curative potential. This study means have a more precise idea of doses to apply in the vineyard. In controlled conditions, the ASM dose giving 90 % efficacy (EC₉₀) against downy and powdery mildew was approximately 6 mM. Similarly way, the EC₉₀ of FOS and PK₂ against downy mildew was 2.5 mM, whereas against powdery mildew, this dose was higher (more than 4.21 and 9.55 mM, respectively).

In conclusion, with this study we provide results of the direct effects on inhibition of growth of *E. necator* and *P. viticola* of two phosphonates (fosetyl-aluminium used as a fungicide and PK₂ used as a foliar fertilizer) as well as the possible indirect effects of the products on the stimulation of grapevine defenses. For the first time, we showed that depending on the variability of the pathogen (inter- or intra-species), the efficacy of these compounds can be very variable. We corroborate the fact that acibenzolar-*S*-methyl exhibits no direct effect on the two pathogens and the efficacy observed may result from an induction of grapevine defenses. The findings of this study have important implications for developing the use of plant defense stimulators which may or not have a double action. The use of products such as phosphonates or ASM with direct or indirect action and able to stimulate grapevine defense could help to limit the appearance of resistance to uni-site fungicides and reduce the use of fungicides harmful to the environment. To develop and support sustainable viticulture, the use of plant defense stimulators, may represent a promising low-impact tool for the control of grapevine diseases. However, our study shows that the diversity of pathogens can have an impact on the efficacy of these compounds. More research on the diversity of pathogen populations and the effect of these compounds on different varieties of grapevine needs to be undertaken before developing new pest management strategies. Although effective stimulation of plant defenses shows good, reproducible, results in laboratory conditions, the use of these compounds in the vineyard is more difficult and usually shows disappointing results. Further research should be done to investigate the use of phosphonates and ASM in the vineyard. This is an important issue for future research and for optimization of their use in commercial vineyards.

This study also gives us a more precise idea of doses to be applied. Although in controlled conditions, the minimal dose providing 90 % efficiency of ASM (EC₉₀) against downy and powdery mildew was approximately 6 mM. That of FOS and PK₂ against downy mildew was 2.5 mM, whereas against powdery mildew, this dose was never reached (more than 4.21 and 9.55 mM respectively). During a trial implementation to assess efficiency of these products in the vineyard, it would be sensible to apply doses higher than or equal to these EC₉₀.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Bordeaux Wine Trade Council (CIVB) and INRA. We are grateful to G. Taris and S. Gambier for their technical assistance, to L. De

Bastard from Syngenta for supplying acibenzolar-S-methyl, JP Soyer for supplying PK₂ and to J. Coulter for reading the English manuscript.

REFERENCES

- 1 Lafon R and Clerjeau M, Downy mildew, in *Compendium of grape diseases*, by Pearson PC, ed. Goheen AC, APS Press, Minnesota, USA, pp. 11-13 (1988).
- 2 Chen WJ, Delmotte F, Richard-Cervera S, Douence L, Greif C and Corio-Costet MF, 2007. At Least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Appl Envir Microbiol* **73**:5162-5172 (2007).
- 3 Gisi U, Waldner M, Kraus N, Dubuis PH and Sierotski H, 2007. Inheritance of resistance to carboxylic acid amide (CAA) fungicides in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathol* **56**:199-208 (2007).
- 4 Délye C, Laigret F and Corio-Costet MF, RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. *Phytopathol* **87**: 670-677 (1997).
- 5 Evans K J, Whisson DL, Stummer BE and Scott ES, DNA markers identify variation in Australian populations of *Uncinula necator*. *Mycol Res* **101**: 923-932 (1997).
- 6 Amrani L and Corio-Costet MF, A single nucleotide polymorphism in the beta-tubulin gene distinguishing two genotypes of *Erysiphe necator* expressing different symptoms on grapevine. *Plant Pathol* **55**: 505-512 (2006).
- 7 Montarry J, Cartolaro P, Delmotte F, Jolivet J and Willocquet L, Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during Grapevine powdery mildew epidemics. *Appl Envir Microbiol* **74**: 6327-6332 (2008).
- 8 Corio-Costet MF, *Erysiphe necator*. Monograph, Tec/Doc Lavoisier, Paris, 132 p (2007).
- 9 Dufour MC, Fontaine S, Montarry J and Corio-Costet MF, Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Manag Sci* **67**:60-69 (2011).
- 10 Gisi U, Sierotzki H, Cook H and McCaffery A, Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag Sci* **58**: 859-867 (2002).
- 11 Corio-Costet MF, Dufour MC, Cigna J, Abadie P and Chen WJ, Diversity and Fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *Eur J Plant Pathol* **129**: 315-329 (2011).

- 12 Delye C, Laigret F and Corio-Costet MF, A mutation in the 14 Δ -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl Envir Microbiol* **63**: 2966-2970 (1997).
- 13 Walters D, Newton A and Lyon G, Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. Blackwell, Oxford, UL, pp. 258 (2007).
- 14 G Lyon, Agents that can elicit induced resistance, in *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*, ed. By Walters D, Newton A and Lyon G, Blackwell, Oxford, UL, pp. 9-29 (2007).
- 15 Garcion C, Lamotte O and Métraux JP, Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology, in *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*, ed by Walters D, Newton A and Lyon G, Blackwell, Oxford, UL, 109-123 (2007).
- 16 Siegrist L, Glenewinkel D, Kolle C and Schmidtke M, Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. *Zeit Pflanzenkr Pflanzensch* **104**: 599-610 (1997).
- 17 Friedrich L, Lawton K, Ruess W, Masner P, Specker N, Gut Rella M, Meier B, Dincher S, Staub T, Uknes S, Métraux JP, Kessmann H and Ryals J, A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J* **10**: 61-70 (1996).
- 18 Bressan A and Purcell AH, Effect of benzothiadiazole on transmission of X-disease phytoplasma by the vector *Colladonus montanus* to *Arabidopsis thaliana*, a new experimental host plant. *Plant Dis* **89**: 1121-1124 (2005).
- 19 Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV and Paulin JP, Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *Eur J Plant Pathol* **106**, 529-536 (2000).
- 20 Dann EK, Deverall BJ, Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Pathology* **49**, 324-332 (2000).
- 21 Perazzolli M, Dagostin S, Ferrari A, Elad Y and Pertot I, Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biol Control* **47**, 228-234 (2008).
- 22 Pajot E and Silué D, Evidence that DL-3-aminobutyric acid and acibenzolar-S-methyl induce resistance against bacterial head rot disease of broccoli. *Pest Manag Sci* **61**: 1110-1114 (2005).

- 23 Lawton KA, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T and Ryals J, Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J* **10**: 71-82 (1996).
- 24 Hukkanen A, Kokko H, Buchala A, Häyrynen J and Käenlampi S, BTH affects the leaf proteome in arctic bramble (*Rubus arcticus*). *Mol Plant Pathol* **9**:799-808 (2008).
- 25 Iriti M, Rossoni M, Borgo M and Faoro F, Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *J Agric Food Chem* **52**: 4406-4413 (2004).
- 26 Bovie C, Ongena M, Thonart P and Dommes J, Cloning and expression analysis of cDNAs corresponding to genes activated in cucumber showing systemic acquired resistance after BTH treatment. *BMC Plant Biol* **26**:4-15 (2004).
- 27 MacDonald AE, Grant BR and Plaxton WC, Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *J Plant Nutr* **10**: 41505-51519 (2001).
- 28 Jackson TJ, Burgess T, Colquhoun I and Hardy GES, Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol* **49**: 147-154 (2000).
- 29 Smillie R, Grant BR and Guest D, The mode of action of phosphite - evidence for both direct and indirect modes of action on 3 *Phytophthora* spp in Plants. *Phytopathol* **79**: 921-926 (1989).
- 30 Guest D and Grant B, The Complex Action of Phosphonates as Antifungal Agents. *Biol Rev Cambridge Phil Soc* **66**: 159-187 (1991).
- 31 Hardy GES, Barrett S and Shearer BL, The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Aust Plant Pathol* **30**: 133-139 (2001).
- 32 Daniel R and Guest D, Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Mol Plant Pathol* **67**: 194-201 (2006).
- 33 Eshraghi L, Anderson J., Aryamanesh N, Shearer B, McComb J, Hardy GESTJ and O'Brien PA, Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol* **xx : xxx** Doi : 10.1111/j.1365-3059.2011.02471.x (2011).
- 34 Bompeix G and Saindrean, *In vitro* antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid on *phytophthora* species. *Fruits* **39**: 777-786 (1984).

- 35 Fenn ME and Coffey MD, Further evidence of the direct mode of action of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology* **75**: 601-611 (1985).
- 36 Dercks W and Creasy LL, Influence of fosetyl-Al on phytoalexin accumulation in the *Plasmopara viticola* grapevine interaction. *Physiol MolPlant Pathol* **34**: 203-213 (1989).
- 37 Guest DI, Modification of defence responses in tobacco and capsicum following treatment with fosetyl-Al aluminium tris (o-ethyl phosphonate). *Physiol Plant Pathol* **25** (1984).
- 38 Andreu AB, Guevara MG, Wolski EA, Daleo GR and Caldiz DO, Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. *Pest Manag Sci* **62**: 162-170 (2006).
- 39 Lafon R, Bugaret Y and Bulit J, New prospects for controlling grapevine downy mildew (*Plasmopara viticola*) with a systemic fungicide, aluminium ethylphosphite. *Phytiatrie-Phytopharmacie* **26**: 19-40 (1977).
- 40 Soyez JL, New phosphonates and potassium polyvalents for use in viticulture (1993-2001). *Progres Agricole et Viticole* **118**: 487-490 (2001).
- 41 Delye C and Corio-Costet MF, Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*: RAPD analysis discriminates two biotypes. *Mycol Res* **102**: 283-288 (1998)
- 42 Debieu D, Corio-Costet MF, Steva H, Malosse C and Leroux P, Sterol composition of the wine powdery mildew fungus: *Uncinula necator* sensitive or resistant strains to the sterol biosynthesis inhibitor: triadimenol. *Phytochem* **39**:293-300 (1995).
- 43 Délye C, Laigret F and Corio-Costet MF, New tools for studying epidemiology of resistance of grape powdery mildew to DMI fungicides, *Pestic Sci* **51**: 309-314 (1997).
- 44 Sombardier A, Dufour MC, Blancard D and Corio-Costet MF, Sensitivity of *Podosphaera aphanis* isolates to DMI fungicides: distribution and reduced cross-sensitivity. *Pest Manag Sci* **66**: 35-43 (2011).
- 45 Peressotti E, Duchene E, Merdinoglu D and Mestre P, A semi-automatic non-destructive method to quantify grapevine downy mildew sporulation. *J Microbiol Methods* **84**: 265-271 (2011).
- 46 Munoz A and Moret A, Sensitivity of *Botrytis cinerea* to chitosan and acibenzolar-S-methyl. *Pest Manag Sci* **66**:974-979.
- 47 Speiser B, Berner A, Haseli A and Tamm L, Control of downy mildew of grapevine with potassium phosphonate: Effectivity and phosphonate residues in wine. *Biol Agric Hort* **17**: 305-312 (2000).

- 48 Coffey MD and Joseph MC, Effects of phosphorous acid and fosetyl-Al on the life cycle of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola*. *Phytopathol* **75**: 1042-4046 (1985).
- 49 Farih A, Tsao PH and Menge JA, Fungitoxic activity of fosetyl aluminium on growth sporulation and germination of *Phytophthora parasitica* and *P. citrophthora*. *Phytopathol* **71**:934-936 (1981).
- 50 Matheron ME and Porchas M, Impact of Azoxystrobin, Dimethomorph, Fluazinam, Fosetyl-AL, and Metalaxyl on growth, sporulation and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp. *Plant Dis* **84**:454-458 (2000).
- 51 Dufour MC, Lambert C, Bouscaut J, Merillon JM and Corio-Costet MF, Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*). *Plant Pathol*, submitted november 2011.
- 52 Rohilla R, Singh US and Singh RL, Mode of action of acibenzolar-*S*-methyl against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Pest Manag Sci* **58**:63–69 (2001).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Growth inhibition of *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola* after leaf treatment with different concentrations of ASM. Data corresponded to the mean of at least three independent experiments for *E. necator* (dotted lines, triangle) with N= 10 for group A isolates (white) and N = 8 for group B (black), and *P. viticola* (full lines, square) with N = 2 for fungicide- sensitive isolates (white) and N = 4 for fungicide- resistant isolates (dark).

Figure 2. Direct effect of ASM on *P. viticola* and *E. necator* spore productions. Box plot representations of pixel numbers obtained after image analysis.

Figure 3. Graph represents spore quantification of *E. necator* with a particle counter. (Coulter Statistical differences were shown by different letters at the threshold of 0.05 %.

Figure 4. Graph represents disease intensity by measuring growth and intensity of of *P.viticola* sporulations. Sporangia suspensions were incubated with different compounds one hour before dilution at 1/10 and inoculation. Fungicide (Champ Flo®) at 100 m L⁻¹ and distilled water were used as positive and negative controls, respectively. Statistical differences were shown by different letters at the threshold of 0.05 %.

Figure 5. Growth inhibition of *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola* after leaf treatment with different concentrations of FOS. Data corresponded to the mean of at least three independent experiments for *E. necator* (dotted lines, triangle) with N= 10 for group A isolates (white) and N = 8 for group B isolates (black), and *P. viticola* (full lines, square) with N = 2 for fungicide- sensitive isolates (white) and N = 4 for fungicide- resistant isolates (dark).

Figure 6. Growth inhibition of *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola* after leaf treatment with different concentrations of PK₂. Data corresponded to the mean of at least three independent experiments for *E. necator* (dotted lines, triangle) with N= 10 for group A isolates (white) and N = 8 for group B isolates (black), and *P. viticola* (full lines, square) with N = 2 for fungicide- sensitive isolates (white) and N = 4 for fungicide- resistant isolates (dark).

Table 1. Characteristics of *P. viticola* and *E. necator* isolates. ¹:Sensitivity to fungicide famoxadone; ²:Sensitivity to iprovalivarb; ³:Sensitivity to mefenoxam. S=sensitive isolate, R=Resistant isolate.

Pathogen	Isolates	Locality of vineyard	Sampling year	Fungicide sensitivity		
				FAM ¹	IPRO ²	MEF ³
<i>P. viticola</i>	PIC 59	Bordeaux	2003	R	S	R
	Pv-R MIC 128	Bordeaux	2005	R	R	S
	Pv-R PAU 32	Bordeaux	2003	R	S	R
	Pv-R EAU 08	Armagnac	2005	R	R	S
	Pv-S FLE 01	Beaujolais	2004	S	S	S
	Pv-S COU 15	Bordeaux	2004	S	S	S
				Genetic group		
	PVR 43	Languedoc-Roussillon	2003		A	
	BR 33	Pays de l'Aude	2002		A	
	LLU 70	Pyrénées-orientales	2006		A	
	LLU 41	Pyrénées-orientales	2006		A	
	LLU 55	Pyrénées-orientales	2006		A	
	PV 15	Pays de l'Aude	2006		A	
	PV 33	Pays de l'Aude	2006		A	
	PVR 38	Languedoc-Roussillon	2005		A	
<i>Erysiphe necator</i>	ORA 4	Languedoc-Roussillon	2003		A	
	ORA 3	Languedoc-Roussillon	2003		A	
	LAT 12	Bordeaux	2003		B	
	CC 49	Bordeaux	1999		B	
	CHL 02	Bordeaux	2004		B	
	PAL 01	Bordeaux	2003		B	
	2B 15	Pays de l'Aude	2000		B	
	PV 28	Pays de l'Aude	2006		B	
	PV 46	Pays de l'Aude	2006		B	
	PV 74	Pays de l'Aude	2006		B	

Table 2. Effective concentrations inhibiting growth at 50% (EC₅₀) obtained from dose-response curves. Stars represent the significant values at the threshold of 0.05 %.

Mildew isolates	EC ₅₀ (mM ± SEM)		
	ASM	FOS	PK ₂
<i>P. viticola</i> - Fungicide- resistant	0.47 ± 0.06	0.52 ± 0.04	1.27 ± 0.08
<i>P. viticola</i> - Fungicide- sensitive	0.53 ± 0.13	0.48 ± 0.07	0.64 ± 0.02
<i>E. necator</i> - Group A	1.05 ± 0.28	3.30* ± 0.46	7.44* ± 1.38
<i>E. necator</i> - Group B	0.95 ± 0.10	0.89 ± 0.32	6.36* ± 1.53

Figure 1. Growth inhibition of *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola* after leaf treatment with different concentrations of ASM.

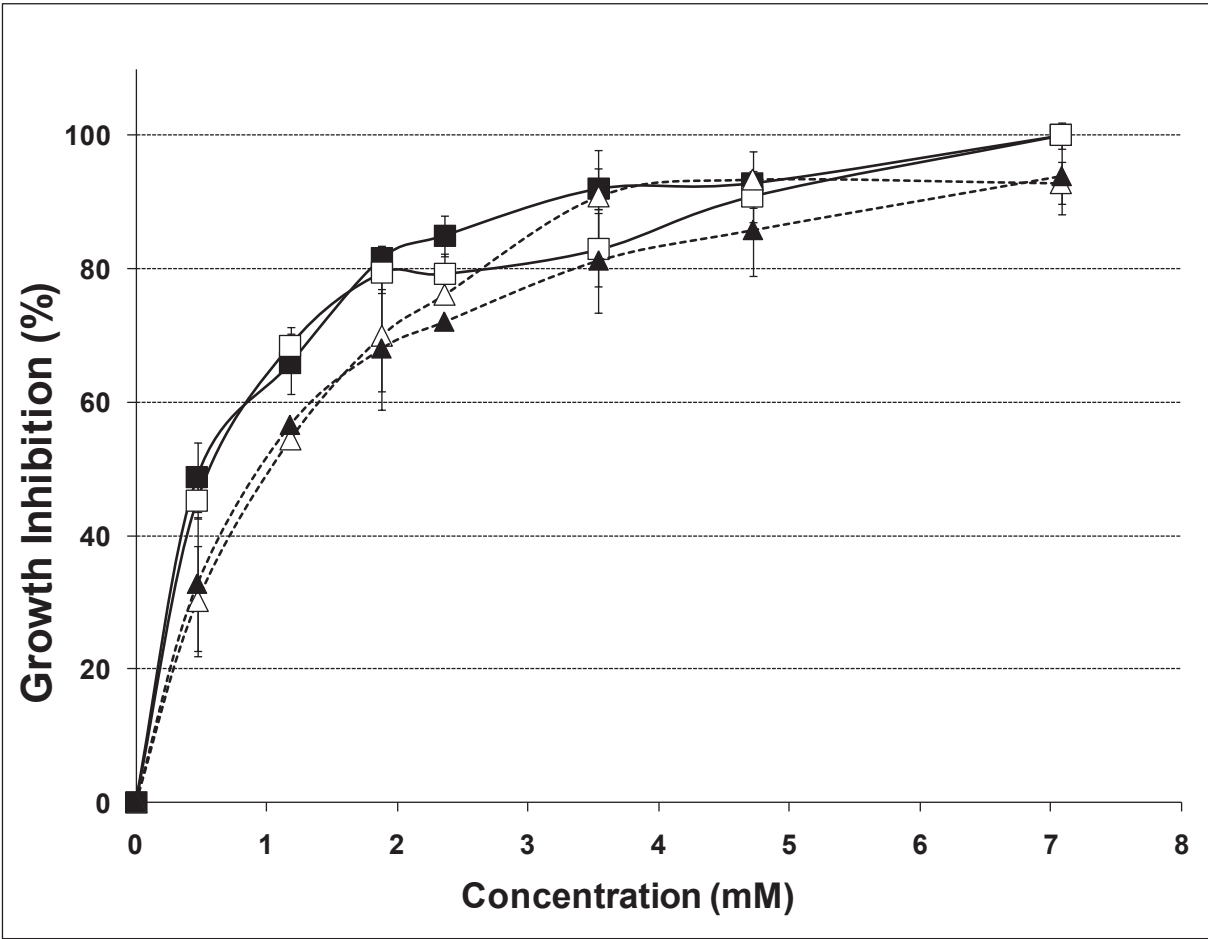


Figure 2. Analysis of direct effect of ASM on *P. viticola* and *E. necator* growth.

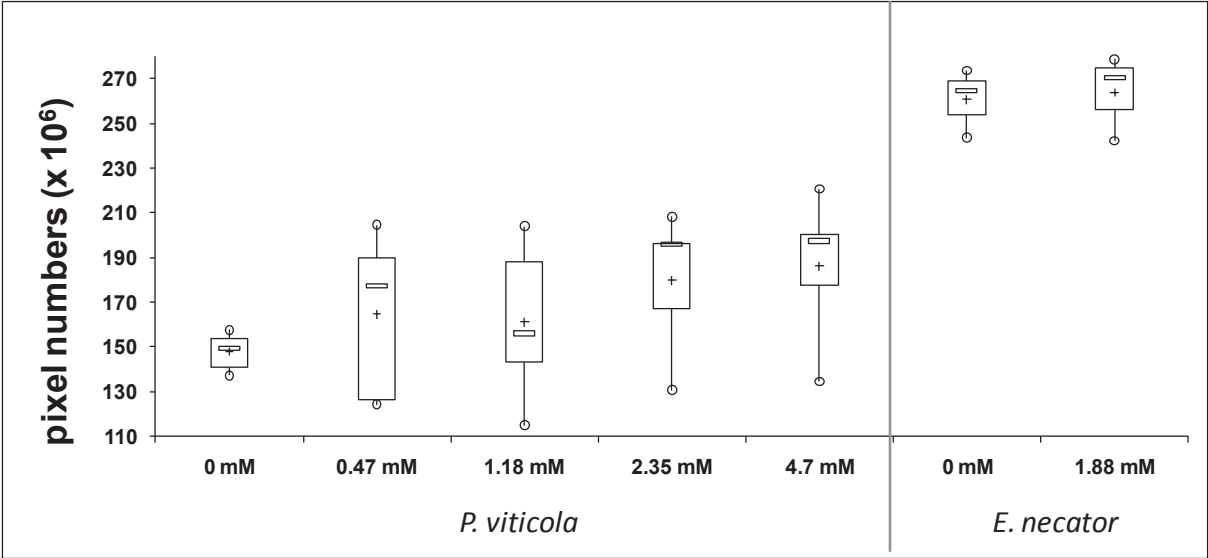


Figure 3: Direct effect of Phosphonates and ASM on *E. necator* spore production.

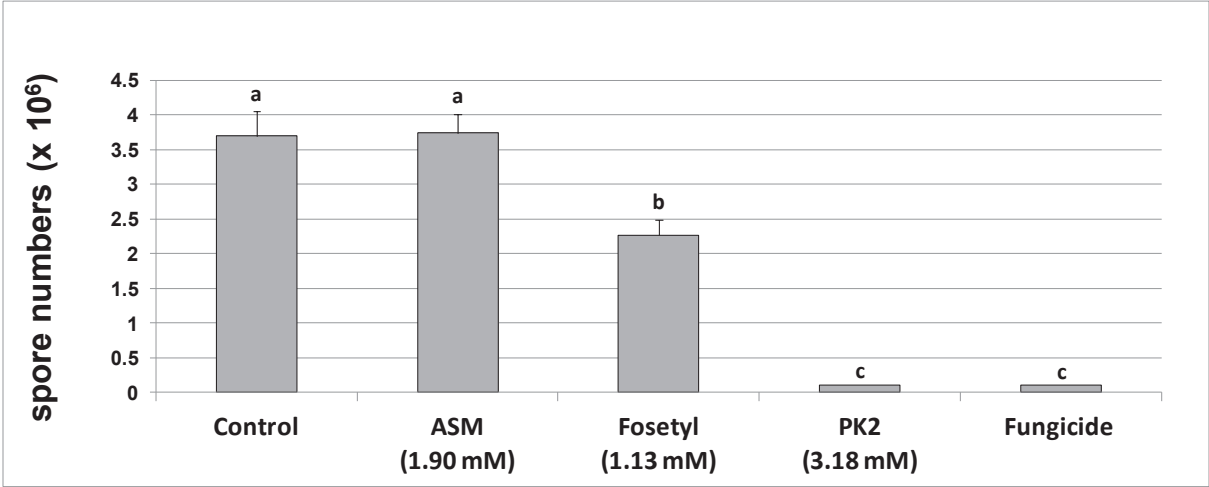


Figure 4. Direct effect of phosphonates and ASM on *P. viticola* growth.

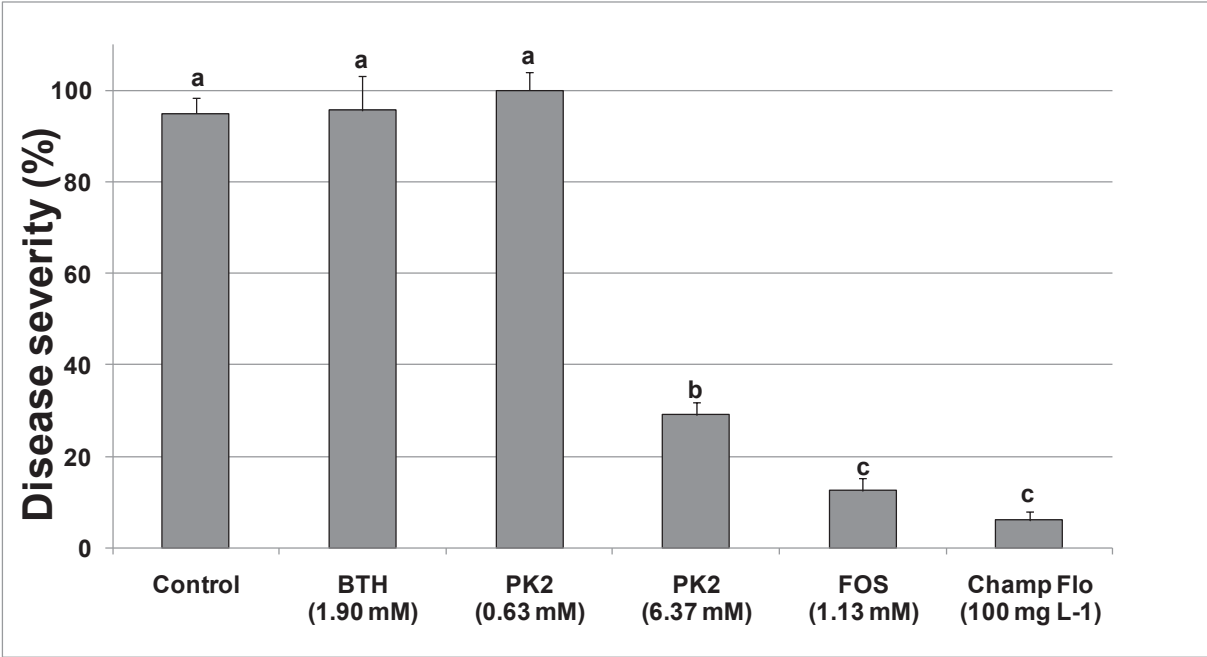


Figure 5. Growth inhibition of *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola* after leaf treatment with different concentrations of FOS.

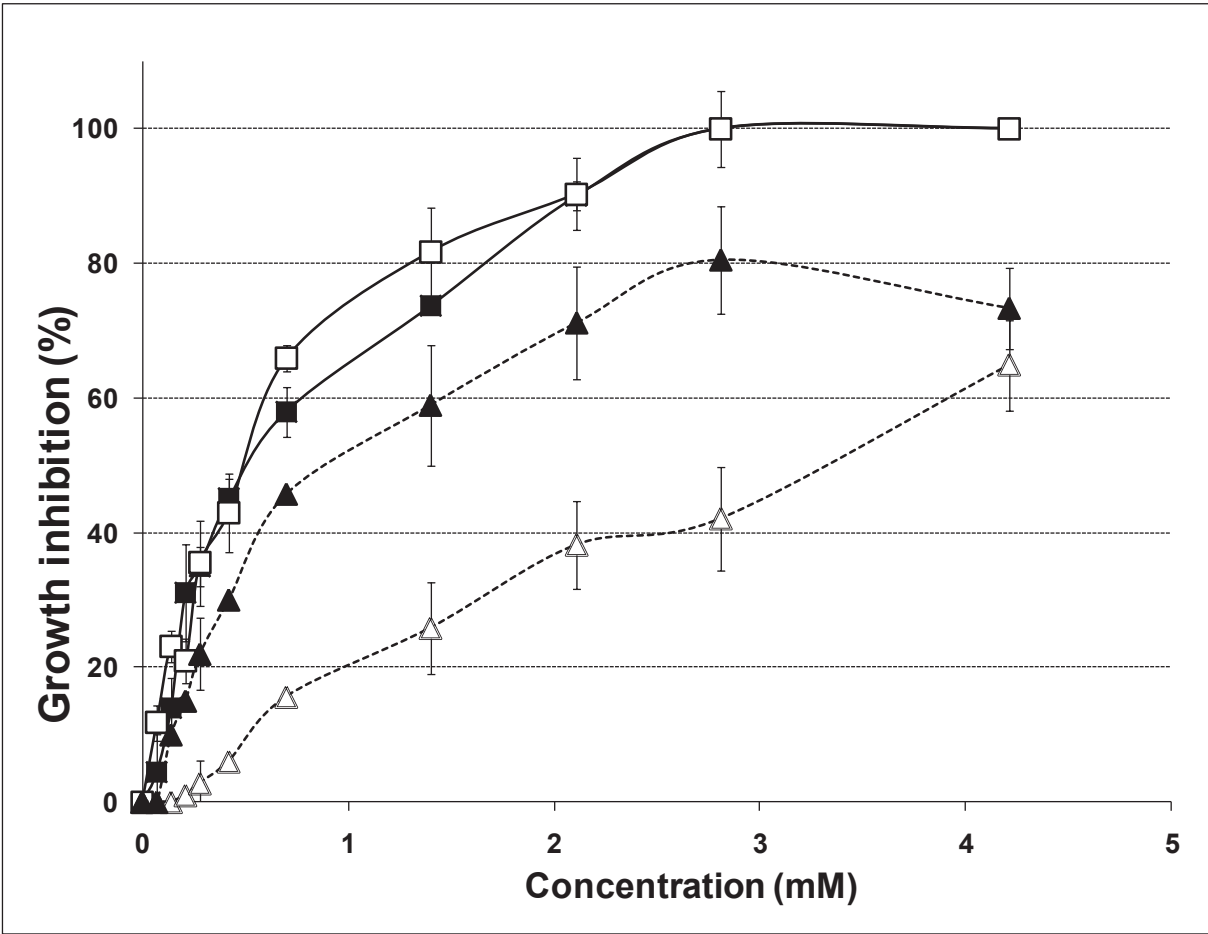
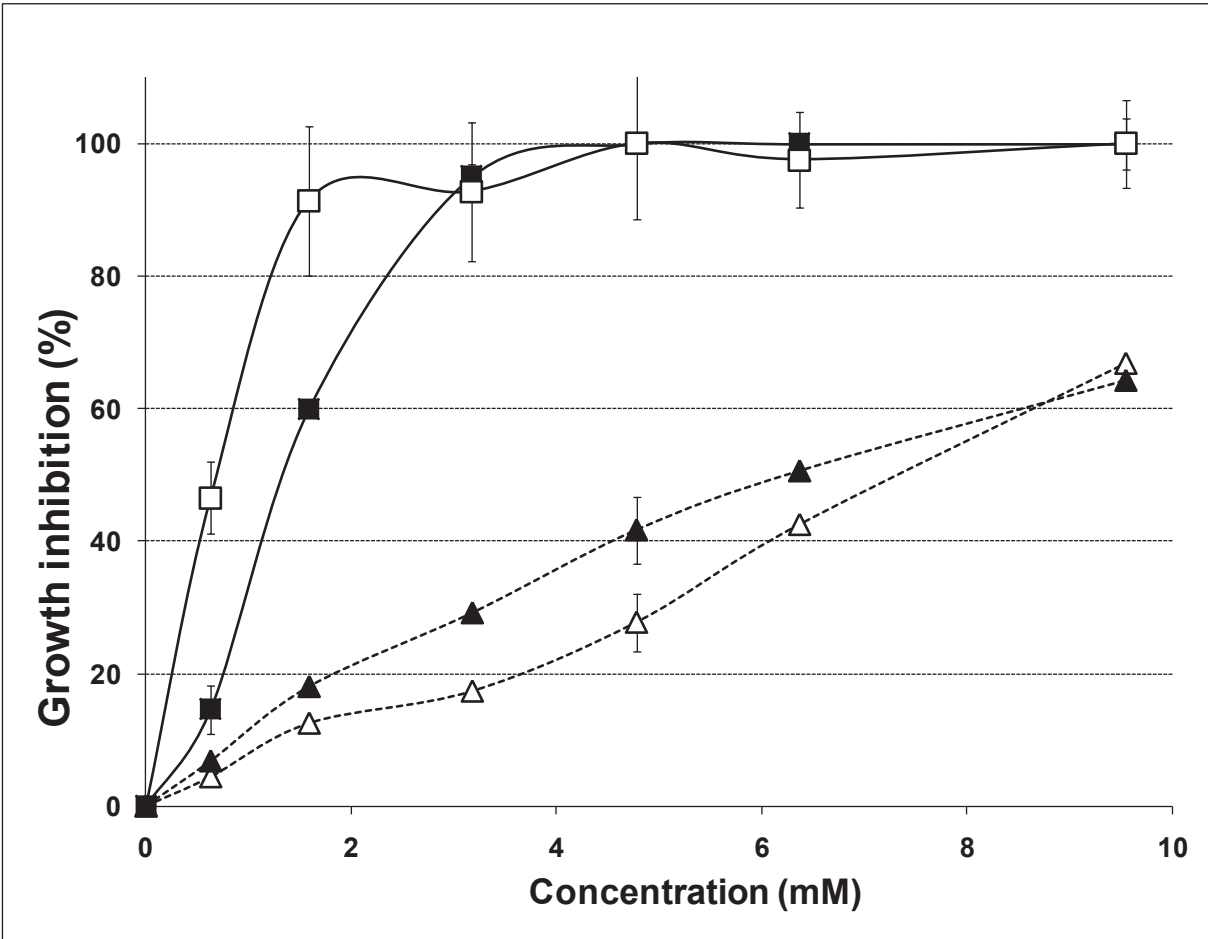


Figure 6. Growth inhibition of *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola* after leaf treatment with different concentrations of PK₂.



1 **2.2. Benzothiadiazole-primed defense responses and enhanced differential**
2 **expression of defense genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic**
3 **pathogens (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*).**
4

5 M. C. Dufour^a, C. Lambert^b, J. Bouscaut^a, J. M. Mérillon^b and M. F. Corio-Costet^{a*}

6 ^aINRA, UMR Santé Végétale (1065), ISVV, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon, France.

7 ^b Université de Bordeaux, ISVV, GESVAB, EA 3675, 33140 Villenave d'Ornon, France.

8

9

10

11 **Running title:** Elicitation and grapevine responses to mildews

12 **Key words:** ASM, plant defense genes, polyphenols, grapevine, downy mildew, powdery

13 mildew, BTH,

14

15

16

17

18 Sous presse à Plant Pathology (N° PP-11-392)

19

1 Benzothiadiazole-primed defense responses and enhanced differential expression of defense
2 genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens (*Erysiphe necator* and *Plasmopara*
3 *viticola*).

4

5

6

7

8 M. C. Dufour^a, C. Lambert^b, J. Bouscaut^a, J. M. Mérillon^b and M. F. Corio-Costet^{a*}

9

10 ^aINRA, UMR Santé Végétale (1065), ISVV, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon, France.

11 ^b Université de Bordeaux, ISVV, GESVAB, EA 3675, 33140 Villenave d'Ornon, France.

12

13 *Corresponding author e-mail:

14 MF Corio-Costet

15 INRA, UMR Santé Végétale, (1065), ISVV, BP 80, 33883 Villenave d'Ornon, France.

16 Tel: 33 (0)5 57 12 26 25

17 Fax: 33(0) 5 57 12 26 21

18 coriocos@bordeaux.inra.fr

19

20 Running title: Elicitation and grapevine responses to mildews

21 Key words: ASM, plant defense genes, polyphenols, grapevine, downy mildew, powdery
22 mildew, BTH,

23

24

1 **Summary**

2 Benzothiadiazole (BTH), a salicylic acid analogue, strengthens plant defence mechanisms
3 against a broad spectrum of pathogens. The role of BTH was investigated in the enhanced
4 resistance of grapevine leaves pre-treated with BTH in response to infection with various
5 isolates of downy and powdery mildews (*Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*). Tools
6 were developed to better assess the defence status of the plant. In compatible interactions
7 amongst a set of 19 genes, more than 57.2 % of *P. viticola* infected-leaves (*Pv*-infected leaves)
8 and 90% of *E. necator*-infected leaves (*En*-infected leaves) of differentiated transcripts were
9 down-regulated at 24 hpi, indicating a manipulation of host response by the pathogens. BTH
10 treatment enhanced grapevine defenses allowing pathogen growth to be inhibited from 61 to
11 98%, depending on the pathogen variability. Treatment also triggered up-regulation of
12 pathogenesis-related protein genes such as *PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR8*, *PR-10*, in *Pv*-infected
13 leaves, whereas in *En*-infected leaves, *PR-3*, *PR-10* and *PR-6* transcripts were preferentially up-
14 regulated. We also show that treatment with BTH led to regulation of indole pathway
15 transcripts: in particular, anthranilate synthase was down-regulated at 24 hpi in all infected
16 leaves, then strongly up-regulated afterwards according to the rate of pathogen development.
17 Quantitation of polyphenols and stilbenes showed that pterostilbene was specifically
18 accumulated in pre-treated leaves and associated with biological efficacy and significant
19 increases in PR-protein gene transcripts. The temporal evolution of defence-related genes in
20 pre-treated infected leaves suggested that grapevine responses vary depending on the inter or
21 intra-species variability of pathogens.

22

23 **Introduction**

24 Powdery (*Erysiphe necator*) and downy mildew (*Plasmopara viticola*) are very important
25 grapevine diseases (*Vitis vinifera*). These two biotrophic pathogens, which are native to the
26 United States, infect green vine tissues and cause significant economic loss as well as
27 environmental damage through the repetitive applications of fungicides.

28 The biotrophic oomycete *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.), the causal agent of downy
29 mildew, is a heterothallic endoparasite (Lafon & Clerjeau, 1988). Its development involves
30 intercellular mycelia growth and the differentiation of haustoria, which penetrate parenchyma
31 cells. Its population diversity in Europe is low, but it exhibits various phenotypes and genotypes
32 (e.g. fungicide resistance) (Chen *et al.*, 2007). By contrast, *Erysiphe necator* (grapevine

1 powdery mildew) is an ascomycete, an ectoparasitic biotrophic fungus. In Europe, its
2 populations are divided into two distinct genetic groups, A and B, that have different ecological
3 requirements (Amrani *et al.*, 2006). Furthermore, group A isolates are significantly more
4 sensitive to various fungicides than those in group B (Dufour *et al.*, 2011).

5 Plants possess the ability to defend themselves against pathogens, but the success of these
6 defenses depends on the rapidity and/or on the intensity of their response, in addition to
7 activating the defense mechanisms. Indeed, if the defenses are activated too late, the pathogen
8 colonizes plant tissue. However, a part of these defenses can be induced and confer protection
9 against a wide spectrum of pathogens either locally to confine the pathogens at the infection
10 site, or systemically to lead to the development of resistance within the whole plant (Walters *et*
11 *al.*, 2007). Typically, this inducible resistance system can be associated with the accumulation
12 of salicylic acid (SA), a molecule required for signal transduction in systemic acquired
13 resistance (SAR) (Pieterse & Van Loon, 2007), leading to the coordinated accumulation of
14 pathogenesis-related proteins (PR proteins), the production of phytoalexins, and the
15 reinforcement of plant cell walls. Recently, the application of inducers that mimic natural
16 signaling compounds and have no direct antifungal activity, such as acibenzolar-S-methyl or
17 benzothiadiazole (BTH), has been shown to be effective against a broad spectrum of pathogens
18 in various plants (Sticher *et al.*, 1997; Brisset *et al.*, 2000; Bressan *et al.*, 2005). Today, SAR
19 induced by BTH has been clearly established as being dependent on the salicylic acid pathway
20 (Friedrich *et al.*, 1996), with consequent regulation of the genes involved in primary and
21 secondary metabolisms, and also the accumulation of phenolic compounds (Lawton *et al.*,
22 1996; Brisset *et al.*, 2000; Iriti *et al.*, 2004; Hukkanen *et al.*, 2008). Amongst the PR-proteins,
23 *PR-1* protein transcripts are usually induced and represent a marker for SA signaling.

24 In the presence of pathogen, grapevine triggers defense mechanisms with variable success
25 depending on the degree of resistance of the varieties, thus suggesting the basal induction of
26 defenses (Fung *et al.*, 2008). Indeed, genes encoding cytoskeletal and phenylpropanoid
27 pathways are primarily up-regulated during infection (Polesani *et al.*, 2008), as well as genes
28 encoding PR-proteins such as β -1,3-glucanase (*PR-2*), chitinase (*PR-8*), and *PR-1*, *PR-10*,
29 *PR-5* (Legay *et al.*, 2011). The success of a plant's defenses depends on the final output
30 resulting from the interactions of various factors, including the genetic and the physiological
31 characteristics of both partners in the host-pathogen interaction, as well as on environmental
32 conditions.

33 Elicitors could be used to reinforce the inherent defenses in susceptible cultivars. In *Vitis*
34 *vinifera*, gene expression was documented after the use of inducers, (Gomes & Coutos-

1 Thévenot, 2009), in interactions between the *Vitis* species and *Plasmopara viticola*
2 (Hamiduzzaman *et al.*, 2005; Trouvelot *et al.*, 2008), and between *Vitis* and *Erysiphe necator*
3 (Jacobs *et al.*, 1999; Fung *et al.*, 2008; Belhadj *et al.*, 2008). The efficacy of plant defense
4 stimulation usually provides good, reproducible results in the laboratory, but efficacy in the
5 field is often disappointing (Campbell & Latorre, 2004; Perazolli *et al.*, 2008).
6 The present study sought to elucidate the role played by BTH as an elicitor on infected
7 grapevine leaves, and to identify defence markers specific or not of pathogen variability (intra
8 or inter species). The evolution of transcript profiles of selected defence-related genes during
9 *Vitis vinifera*-biotrophic pathogen interaction was characterized, and the impact of pathogen
10 diversity was investigated in the absence or presence of BTH elicitation. The relationship
11 between transcript profiles, polyphenol contents and pathogen control should contribute to
12 understanding the basics of the behaviour of grapevine after elicitation with BTH and its ability
13 to enhance its defenses when subjected to various pathogens.

14

15 **Materials and methods**

16 **Plant and fungal materials**

17 Grapevine plants (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) were propagated from wood cuttings
18 in a greenhouse. After three weeks, rooted cuttings were potted in a sandy soil and were grown
19 under controlled conditions at 25/20°C day/night temperature, with 75% relative humidity, a
20 16-h photoperiod (0.51W/m²) with weekly fertilization (2g.L⁻¹, N-P-K 20 % with trace
21 elements). Two-month-old plants with 10-12 leaves were used for the experiments, and the
22 third and fourth leaves at their apex were used for powdery and downy mildew inoculations,
23 respectively.

24 *Plasmopara viticola*: A fungicide-sensitive isolate and a fungicide-resistant isolate from the
25 laboratory monospore collection were multiplied on grapevine leaves and inoculated as
26 described in Corio-Costet *et al.*, (2011) (Table1), with spore suspension at 5000 sporangia.mL⁻¹
27 by 15 µL drops per leaf, and incubated for 7 days at 22°C with a 16-8 h photoperiod.

28 *Erysiphe necator*: Powdery mildew isolates (one belonging to group B and one to group A),
29 (Table 1) were inoculated under sterile conditions on decontaminated grape leaves, as
30 previously described (Debieu *et al.*, 1995) by blowing spores from sporulating leaves (1000
31 conidia per cm² of leaf), and were incubated for 12-14 days at 22°C with a 16-8 h photoperiod.

32

33 **Leaf treatment with BTH and inoculation with pathogens**

1 BTH (S-methyl benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioate, Bion®, 50WG, Syngenta) was
2 dissolved in water and sprayed onto leaves at the concentration of 1.90 mM, 24 h before
3 inoculation with the different pathogens. The experimental protocol for each sampling time
4 point (0 hpi, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi) corresponded to six untreated leaves and six BTH-treated
5 leaves that were inoculated or not with each of four isolates used during this experiment. For
6 each sampling point, six half leaves were used for biochemical analysis and the six other half
7 leaves were used for gene expression. In addition, six other leaves treated with BTH or not
8 were inoculated to confirm the biological efficacy of BTH treatment. The development of the
9 disease was assessed 7 days after downy mildew inoculation or 12 days after powdery mildew
10 inoculation. Disease intensity was estimated by measuring growth and intensity of fungal
11 mycelium and sporulation, as described previously (Corio-Costet *et al.*, 2011, Debieu *et al.*,
12 1995), and was expressed as the mean \pm standard deviation of the six replicates. For biological,
13 biochemical and gene expression assays, two independent experiments were carried out over
14 the period. All data were subjected to analysis of covariance by general linear model using the
15 statistical programme Systat 11 (Systat Software, Inc) and significant differences were
16 determined by Tukey's honest significant difference (HSD) test at the level of $P \leq 0.05$.

17

18 **Expression experiments and q-RT-PCR**

19 A series of 20 genes was monitored by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-
20 PCR) by using the γ -chain elongation factor 1 gene (*EF1- γ*) as internal standard to normalize
21 the starting template of cDNA (Table 2). This gene was used because it is not involved in plant
22 response to infections, unlike α -tubulin or actin genes (Polesani *et al.*, 2008), and because it is
23 very stable with mean C_q values of 20.32 ± 0.061 . Treatment, infection or both had no effect on
24 the C_q values of the *EF1- γ* gene.

25 Sprayed leaves in each experimental condition were removed at all time points and frozen at -
26 80°C. Each sample resulted from a mixture of six half leaves from which the mRNA was
27 extracted, and technical duplicates or triplicates were performed. *In fine*, the data are the
28 average of duplicates of at least two independent experiments for the 20 genes.

29 Primers were designed at 60°C T_m to amplify fragments from 75 to 150 bp using primer 3
30 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Table 2). RNAs were extracted according to the
31 method of Reid *et al.*, (2006). Only high quality RNA samples were selected, with an
32 absorbance ratio at 260/280 nm ranging from 1.82 to 2.06 (1.86 ± 0.065). Two μ g of RNA
33 treated by DNase I (RQ1 Rnase-free Dnase, Promega, France) were reverse-transcribed using

1 2 μ M oligo d(T)₁₅, ribonuclease inhibitor and M-MLV Reverse Transcriptase (Promega,
2 France) in compliance with the manufacturer's instruction.

3 The amplification specificity of each qRT-PCR was reinforced by a single peak in melt curve
4 analysis, and no primer was detected. Thereafter, the expression of the selected genes was
5 assessed by using a CFX 96 system thermocycler (Bio-Rad France, Ivry sur Seine) with
6 SYBR[®] Green to detect dsDNA synthesis. For each reaction, 1 μ L of each primer at 1 μ M, and
7 7 μ L of 2X- Blue SYBR Green fluorescein Mix including Hot start DNA polymerase, dNTP
8 and MgCl₂ (Abgene, France) and 5 μ L of cDNAs, were used in compliance with the
9 manufacturer's instructions. The cycling conditions were: denaturation cycle (94°C for 15 min);
10 amplification and quantification cycle repeated 40 times (94°C for 10 s, 55°C for 10 s, 72°C for
11 20 s). Expression ratios for each cDNA were calculated for each time point relative to control
12 leaves at the same time. Relative gene expression was obtained with the formula: fold induction
13 = $2^{-[\Delta\Delta Cq]}$, where $\Delta\Delta Cq = [Cq \text{ GI (unknown sample)} - Cq \text{ EF1}\gamma \text{ (unknown sample)}] - [Cq \text{ GI}$
14 $(\text{reference sample}) - Cq \text{ EF1}\gamma \text{ (reference sample)}]$. GI is the gene of interest, and EF1 γ is the
15 grapevine Elongation Factor1 γ gene used as the internal control. The reference sample chosen
16 for normalization represented 1- fold the expression of the gene of interest (e.g., control leaves
17 untreated and uninoculated). The mean values obtained by this calculation method varied from
18 0.01 to 109.7 (the $\Delta\Delta Cq$ corresponding means ranged from -6.65 to 6.78). The values of
19 $\Delta\Delta Cq$ included between 0 and 1 correspond to repressions.. Each sample was assayed at least in
20 duplicate in each independent experiment. To ensure correct normalization in real-time PCR,
21 amplification efficiencies should be similar. Each PCR system was tested with cDNA samples
22 that were serially diluted 1:10 with distilled water. Amplification efficiencies should be
23 determined from the slope of the log-linear portion of the calibration curve. Specifically, PCR
24 efficiency = $10^{-1/\text{slope}} - 1$, when the logarithm of the initial template concentration of known
25 cDNA amounts (the independent variable) is plotted on the x axis and Cq (the dependent
26 variable) measured by the CFX 96 system software (Bio-RAD, Hercules, CA, USA) is plotted
27 on the y axis. The PCR efficiency of each primer was included between 0.84 and 1.23. The
28 dissociation curves for each amplicon were then analyzed to verify the specificity of each
29 amplification reaction. The dissociation curve was obtained by heating the amplicon from 60°C
30 to 95°C (data not shown).

31 Means of relative expression obtained in control and other treatments and/or inoculations were
32 compared with the analysis of variance using Tukey's post hoc test. Statistical analyses were
33 carried out using the Systat 11 programme (Systat Software, Inc).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Extraction and quantification of stilbenes

Stilbenes were extracted from each sample (80) of dried leaves (100 mg) overnight with 20 mL methanol as described previously (Belhadj *et al.*, 2008) obtained from the gene expression experiment (see below). Two independent experiments were performed. Analysis of stilbenes was carried out by HPLC on a 250 × 4 mm Prontosil Eurobond C18 reverse-phase column (4.0 ID X 250 mm, 5 µm) (Bischoff Chromatography, Leonberg, Germany). Separation was carried out at a flow rate of 1 mL/min with a modified mobile phase composed of (A) H₂O: TFA 1% (97.5/ 2.5, V/V) and (B) ACN: A (80/20, V/V). The run was set as follows: 0 to 5 min, from 10% B to 20% B; 5 min to 19 min, 20% B to 25% B; 19 to 20 min, 25% B to 30% B, 20 to 35 min, from 30% B to 40% B; 35 to 50 min, 40% B; 50 to 55 min, from 40% B to 60% B; 55 min to 56 min, from 60% B to 100% B, 56 to 60 min, 100% B; 60 to 62 min. Fluorimetric detection was performed at $\lambda_{ex} = 300$ nm and $\lambda_{em} = 390$ nm, and stilbene contents were estimated from specific calibration curves as described in Belhadj *et al.*, 2008. Data were expressed as the means (\pm standard deviations) of at least four quantifications. Statistical analysis was carried out using Newman-Keuls or Student *t*-tests at level of $P \leq 0.05$.

Results

BTH induces grapevine resistance against *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*

Activation of grapevine defence by BTH treatment (1.90 mM) 24 hours before inoculation was efficient to control growth of the four mildew isolates (Table 1) exhibiting different phenotypes and genotypes. Growth inhibition ranged from 62.0 to 98.3 % (Fig. 1). Globally, BTH induced inhibition from 62.0 to 73.2% whatever the mildew isolate, except for the downy mildew isolate Mic-128 (*Pv*-R), for which inhibition was significantly better than expected (98.3%) ($P=0.005$). This isolate, which has good fitness (Corio-Costet *et al.*, 2011), has the peculiarity of being resistant to fungicides inhibiting cellulose synthase and mitochondrial cytochrome *b*, suggesting that the BTH effect on grapevine may promote the effectiveness of the plant's defense with regard to this phenotype of *P. viticola*.

Transcript profiles reveal specific responses of the grapevine depending on the species of biotrophic pathogen.

V. vinifera is especially susceptible to mildew. To explore compatible interaction with different obligate pathogens, a comparison in time of transcript profiles of selected genes of leaves

1 infected with two isolates of *P. viticola* (Mic-128: *Pv-R* and Cou-15: *Pv-S*) and two isolates of
2 *E. necator* (Llu-41: *En-A* and Pv-74: *En-B*) was carried out (Table 2). The grapevine defenses
3 were measured by transcript evolution at 24, 48 and 72 hours post-inoculation (hpi) and
4 completed by biological efficacies at 8 or 12 dpi (see above). The gene set used included PR-
5 proteins, some genes involved in the phenylpropanoid pathway, others involved in the oxido
6 reduction system, in the ethylene or oxylipin pathways and others involved in the indole
7 pathway (Table 2, Fig. 2).

8 At 24 hpi, the transcript analysis in grapevine leaves pointed to a down-regulation of genes with
9 57.2 to 58.4% of the differentially-expressed transcripts significantly down-regulated in *P.*
10 *viticola*-infected leaves, and 90% in *E. necator*-infected leaves (Fig. 3A, Table 3). In *Pv*-
11 infected leaves, some transcripts were up-regulated in the presence of two *P. viticola* isolates,
12 such as *PR-3* and *PR-10*. However, transcript profiles also varied depending on the isolate and
13 the genes under consideration (e.g. *PR-1*, *PR-6*, *CHI*, *CHS*). Indeed, in leaves infected with *P.*
14 *viticola* fungicide-sensitive isolate (*Pv-S*), genes involved in the phenylpropanoid pathway
15 (*CHI*, *CHS*) were strongly repressed, whereas in *Pv-R* infected leaves, it was the *LDOX* gene
16 coding for enzyme situated more in down-stream of the pathway which was specifically
17 repressed. In *En*-infected leaves, the PR-protein transcripts (*PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR-8*, *PGIP*)
18 were generally significantly down-regulated.

19 Only four genes behaved in a similar way whatever the pathogen considered: *LDOX*
20 (polyphenol pathway), *ACC* (ethylene pathway), and *GST* (oxidative stress response system)
21 transcripts which were all repressed, and the *CHORM* (indole pathway) transcript which was
22 up-regulated.

23 At 48h hpi (Fig. 3A, Table 3), most of the grapevine transcripts were not affected significantly
24 in *Pv-S* and *En-A*-infected leaves (26.3% and 31.6% of differentiated genes, respectively). By
25 contrast, in *En-B* and *Pv-R*-infected leaves, 42.1 to 57.9% of transcripts were either down or
26 up-regulated. In *Pv*-infected leaves, some PR- protein transcripts were up-regulated such as *PR*-
27 *1*, *PR-2*, *PR-6*, *PR-8*) depending on the isolate under consideration, while in *En*-infected leaves
28 only *PR-3* was over-expressed. A peculiarity of *En*-infected leaves was the accumulation of
29 *STS* transcripts and the repression of *ANR* and *CHORM* transcripts (Table 3). By contrast, an
30 up-regulation of *ANR* and *ANTS* transcripts was specific to *Pv*-infected leaves.

31 At 72 hpi, the majority of differentiated transcripts (83.4 to 100 %) in *P. viticola*-infected
32 leaves were down-regulated, with significant down-regulation of transcripts of the
33 phenylpropanoid pathway (*STS*, *CHI*, *CHS*), PR-proteins, *LOX*, *GST* and *ACC* (Fig. 3A, Table
34 3). In *E. necator*-infected leaves, the down-regulation was also high with 62.5 to 83.4% of

1 differentiated transcripts affected, with *CHI* and *PR-1*, *PR-2* commonly repressed. Only the
2 *LDOX* gene was over-expressed in *En*-infected leaves, suggesting the possibility of metabolic
3 flow towards flavonoid biosynthesis.

5 **Effect of BTH treatment on transcript profile of un-inoculated leaves**

6 To decipher the effect of BTH in grapevine, transcripts were monitored for four days in
7 uninfected leaves. To simplify the gene expression data resulting from transcripts extracted
8 from the third or fourth leaves, the averages obtained are presented in Table 4 and in Fig. 3B.
9 No significant difference in gene expression according to the foliar stage was found except for
10 the expression of the *ANR* gene at 96 hpt ($P= 0.016$, data not shown). Over time, 21 to 36.8%
11 of transcripts were affected (Fig. 3B, Table 4), with up-regulation of PR-protein transcripts
12 mainly at 24 and 48h post-treatment, with a marked over-expression of *PR-1*, *PR-10*, *PR-3*.
13 Stilbene synthase (*STS*), *GST* and *LOX* transcripts were up-regulated at 24 hpi as the chorismate
14 mutase and chorismate synthase genes (*CHORS*, *CHORM*), which points to a possible role in
15 lignin or in SA synthesis required for *PR-1* gene expression (Slusarenko *et al.*, 2003). Amongst
16 the down-regulations, the chalcone isomerase gene (*CHI*) was generally repressed over time
17 after treatment with BTH. Four days after the treatment only the *PR-1* gene was still
18 significantly up-regulated. Over time, we also noticed that BTH treatment triggered the up-
19 regulation on differentiated transcripts which progressively decreased from 100 to 16 % (Table
20 4).

22 **Gene expression in BTH-pre-treated grapevine leaves inoculated with *P. viticola* or *E. necator***

24 Inoculation with downy mildew isolates of BTH treated leaves triggered over-expression of PR
25 proteins (*PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR-6*, *PR-8*, *PR-10*) that varied, in time depending on the isolates
26 inoculated.

27 At 24 hpi in *Pv*-infected leaves, down-regulation essentially involved in the phenylpropanoid
28 and indole pathways was observed (Table 5, Fig. 3B). Transcript down-regulation was more
29 marked in *Pv*-S-infected leaves than in *Pv*-R-infected leaves, perhaps due to the lesser efficacy
30 of BTH treatment on sensitive isolate (*Pv*-S: Cou-15, 62.0% of inhibition) than on a fungicide -
31 resistant isolate (*Pv*-R: Mic-128, 98.3% of inhibition, Fig. 1). At 48 hpi, a majority of PR-
32 proteins (*PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR-10*), stilbene synthase (*STS*) and anthranilate synthase (*ANTS*)
33 transcripts were commonly up-regulated in *Pv*-infected leaves. As shown in Table 5 and Fig.
34 3B, in *Pv*-R-infected leaves, *LOX*, *ACC* and *GST* genes were also up-regulated, whereas in *Pv*-

1 S-infected leaves, *CHI* and *PR8* genes were more strongly up-regulated. At 72 hpi, the
2 expression profiles were similar in *P. viticola* infected leaves with few genes regulated except
3 for *PR-10* (up-regulated), and *LOX* and *PR-2* genes (down-regulated) (Table 3, Fig. 4B, I, C).
4 In *E. necator*-infected leaves, PR-protein transcripts were over-expressed later than in *Pv*-
5 infected leaves (Table 5, Fig. 3B). At 24 hpi, *PR-10* was up-regulated and *LDOX* and ANTS
6 transcripts were down-regulated, as in downy mildew-infected leaves (Fig. 4B, 4H, Table 5). At
7 48 hpi, few genes were up-regulated and regulation seemed to depend on the isolate under
8 consideration, with no significant up-regulation in *En*-B-infected leaves. By contrast, in *En*-A-
9 infected leaves, several genes were up-regulated (*PR-1*, *PR-6*, *STS*, *LDOX*, *GST*) (Table 5, Fig.
10 4A, 4E, 4G). At 72 hpi, many PR-protein transcripts were up-regulated, e.g. *PR-2*, *PR-3*, *PR-6*,
11 *PR-8* or *PR-10*, as were transcripts involved in the tryptophan pathway (ANTS) (Fig. 3B, 4,
12 Table 5).

13 The evolution of the relative expression of 10 genes undergoing expression modulation over
14 time after pre-treatment with BTH and pathogen inoculations revealed different responses of
15 grapevine leaves according to the isolate under consideration. This was in particularly the case
16 for genes coding for PR-proteins (*PR-1*, *PR-10*, *PR2*, *PR-3*, *PR-6*, *PR-8*), where the plant
17 responses were generally more marked in the presence of downy mildew than powdery mildew
18 (Fig. 4A-F). Interestingly, transcripts of anthranilate synthase (*ANTS*, Fig. 4H) were down-
19 regulated at 24 hpi and could be a common marker of grapevine response to the presence of
20 biotrophic pathogens, such as *PR-10* and *PR-1* genes, which were up-regulated in all infected-
21 leaves after treatment with BTH. Other genes could be specific markers of one pathogen
22 species such as *PR-3*, *PR-8* in *Pv*-infected leaves. Depending on the pathogen isolate, we also
23 noticed faster or slower plant defense responses (e.g. *PR-6* in *En*-treated leaves, or *PR-8* in *Pv*-
24 leaves). For other genes such as *GST* or *STS*, plant responses evolved in the same way whatever
25 the pathogen, but with different intensities, while for other genes such as the *LOX* gene, the
26 evolution was different depending on the isolate (Fig. 4J, GI).

27

28 **Effects of pathogens and BTH on stilbene accumulation**

29 BTH treatment exhibited no significant effect on total polyphenol content in leaves over the
30 three days of analysis (Fig. 5). No significant differences were found depending on the isolate,
31 so we pooled the data of four experiments for each mildew species. A significant increase in
32 total content was obtained only in *Pv*-infected leaves (254 and 233 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry weight) and in
33 *En*-infected leaves (375 and 344 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of DW), without BTH treatment. A more precise
34 quantitation of three major stilbenoid phytoalexins (resveratrol, piceid, and pterostilbene)

1 showed that quantitatively *trans*-piceid produced the highest level of stilbene, with a high
2 increase at 24, 48 and 72 hpi in *En*-infected leaves (Fig. 6A). *Trans*-resveratrol content was
3 very low in uninfected leaves, often less than 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of DW (Fig. 6B), and its content
4 increased strongly in *En*-infected leaves after pre-treatment with BTH or not, and but less in
5 *Pv*-infected leaves (Fig. 6B). Accumulation of *trans*-resveratrol at 24 hpi reached the value of
6 $8.86 \pm 0.75 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of DW, i.e. 6-fold more than in control leaves ($1.42 \pm 0.58 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of DW).
7 Interestingly, only pterostilbene increased significantly in relation to BTH treatment and
8 reached 16.9 to 21 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of DW. The highest quantities were found in *En*-infected leaves after
9 BTH treatment (Fig.6D).

10

11 **Discussion**

12 Treatment of grapevine leaves with BTH led to a significant reduction in *P. viticola* and *E.*
13 *necator* development and induced changes in the expression of transcripts and in pterostilbene
14 contents, depending on the sampling time and the pathogen. Analysis of transcripts of
15 grapevine leaves after application of BTH or not over three days threw light on the potential
16 defense pathway required during the SAR response. After the different mildew attacks, a large
17 proportion of genes were repressed, indicating the suppression of defense responses in *Pv*- and
18 *En*-infected grapevine leaves, as suggested by Polesani *et al.*, (2008). Therefore, the real effect
19 of BTH on gene expression may be underestimated. As gene expression levels are generally
20 expressed relative to un-inoculated and untreated controls, we also expressed data concerning
21 gene expression by changing the calibrator. By calculating the relative gene expression, i.e. the
22 expression of untreated inoculated leaves instead of untreated un-inoculated leaves (Fig. 7) we
23 were obtained the real effect of BTH after inoculation. Therefore, various transcripts (PR-
24 proteins, *STS*, *PAL*, *ACC*, *GST*) were strongly up-regulated in *Pv*-R-infected leaves treated with
25 BTH, and at 24 hpi correlated with better efficacy of grapevine defense on this isolate. The
26 reference chosen to calculate the relative gene expression then became all important, showing
27 that the pathogen can lead to significant down-regulation that may be compensated by the plant
28 defense activator treatment.

29 The transcript pattern of *P. viticola*-infected leaves was significantly different from that of *E.*
30 *necator*-infected leaves, showing that grapevine possesses different defense systems to fight
31 against these two biotrophic pathogens. This may be related to the ectoparasitic development of
32 powdery mildew on leaves and the endoparasitic development of the downy mildew inside
33 tissues, as well as with their speed of development and their biological specificity One of the

1 characteristics of responses associated with BTH is the induction of PR gene transcripts such as
2 PR-1, β -1,3 glucanase (*PR2*), chitinases and thaumatin-like proteins, which are known to
3 accumulate mainly in the extracellular spaces (Van Loon and Van Strien, 1999). Usually, PR-
4 proteins (PR-1, PR-10, chitinases) and enzymes of the phenylpropanoid pathway are
5 modulated, but a broad range of transcripts seem to be dependent on the plant and on the
6 experimental conditions (Lawton *et al.*, 1996; Brisset *et al.*, 2000; Hukkanen *et al.*, 2008).

7 Concerning PR-proteins, the most interesting transcripts, *PR-1*, *PR-10*, *PR-3*, *PR-2* and *PR-*
8 *8*, were significantly increased in time after BTH treatment in infected leaves (Fig. 4A, B, D,
9 F), like other plant species (Van Loon & Van Strien 1999; Brisset *et al.*, 2000; Hukkanen *et al.*,
10 2008). The role of PR-proteins in defense against *P. viticola* remains uncertain because *PR-1*
11 was sometimes but not always induced in infected-leaves of susceptible cultivars (Legay *et al.*,
12 2011). In our study, *PR-1* was the most abundant transcript up-regulated after BTH induction
13 of SAR and it was a common marker for SAR. As previously reported in grapevine (Chong *et*
14 *al.*, 2008; Hamiduzzaman *et al.*, 2007;), BTH treatments strongly induced *PR-1* expression
15 before mildew inoculation, indicating the direct activation of defense processes.

16 As expected, *PR-10* transcripts increased in infected leaves after BTH induction, suggesting
17 that PR-10 may also be a marker of grapevine defense against *P. viticola* and, to a lesser extent,
18 against *E. necator*. The transcripts corresponding to chitinases (*PR-3*, *PR-8*, Fig. 4D, F),
19 glucanase (*PR-2*, Fig. 4C) and *PR-6* (Fig. 4E) exhibited increasing dependence on pathogen
20 isolates. For example, a delay in the transcript over-expression of *PR-3* and *PR6* was observed
21 in *En-B*-infected leaves (Figure 4D, E). We suggest that genetic group A of *E. necator*, which
22 develops more quickly and produces more spores than isolates of genetic group B (Montarry *et*
23 *al.*, 2008), could trigger plant responses earlier in relation to pathogen development. Similarly,
24 at 24 hpi, the transcript level of *PR-8* (Fig. 5F) in *Pv-R*-infected leaves was significantly
25 greater than in *Pv-S*-infected leaves, followed by a higher level of *PR-2* transcripts at 48 hpi
26 (Fig. 4C). The earlier and more intense up-regulation combination could partially explain the
27 better growth inhibition (98.3%) obtained after BTH treatment in *Pv-R*-infected leaves.

28 In our study, the β -1,3 glucanase (*PR-2*) or chitinase transcripts, corresponding to acidic class
29 III endochitinase (*PR-8*) and class IV endochitinase (*PR-3*) were over-expressed more intensely
30 and more durably in infected leaves after BTH treatment and could be considered as markers of
31 BTH induction. Correlation of β -1,3 glucanase (*PR-2*) and chitinase activities with pathogen
32 resistance has been reported and both are thought to boost defence against downy and powdery
33 mildew (Giannakis *et al.*, 1998).

1 PR-proteins in grapevine appear to be part of the front line of defence due to rapid induction of
2 their genes after infection (Gomes & Coutos-Thevenot, 2009), which continue over time up to
3 48 hpi. PR proteins also display synergisms, confirming that in most cases, an assortment of PR
4 proteins belonging to diverse subclasses are induced, rather than one single PR protein (;
5 Brisset *et al.*, 2000).

6 BTH also elicited grapevine defences in infected leaves by triggering up-regulation of *GST*
7 coding for an enzyme involved in the redox status of the plant (Fig. 4J), in accordance with
8 glutathione-S-transferase induction activities that were enhanced by salicylic acid (Sappl *et al.*,
9 2004).

10 The case *ACC*, an enzyme involved in the ethylene pathway, produced in most tissues in
11 response to stresses, was more interesting, since *ACC* transcripts were usually down-regulated
12 in *Pv*-infected leaves. By contrast, after BTH treatment in *Pv*-infected leaves, an up-regulation
13 was observed (Fig 7), suggesting that BTH tended to modulate the *ACC* transcripts, another
14 phytohormone involved other than SA. Moreover, a proteomic analysis identified *ACC* after
15 BTH treatment in arctic bramble (Hukkanen *et al.*, 2008), and Jacobs *et al.*, (1999) reported the
16 induction of *PR-3* and *PR-2* genes after ethephon treatment, two genes that we also found over-
17 expressed after BTH treatment simultaneously with the *ACC* gene. Collective evidence now
18 shows that a coordinated network prevails among SA, JA, ET signalling pathways engaged in
19 the establishment of resistance against a pathogen and the possibility that the ethylene pathway
20 is also involved in BTH elicitation seems to be confirmed by our study.

21 BTH also acted in infected leaves at 24 hpi by down-regulation on aromatic amino acid
22 pathway transcripts (*ANTS*, *CHORM*) followed by up-regulation later on, indicating an effect of
23 BTH either on the secondary salicylic pathway (isochorismate pathway), on lignol synthesis,
24 or on potential indole alkaloid biosynthesis. We suggest that the indole pathway might be
25 involved in grapevine plant defence after elicitation. BTH treatment may act either directly on
26 toxic indole alkaloids biosynthesis (tetrahydro- β -carboline in the grapevine) (Ali *et al.*, 2010),
27 as does *A. thaliana* with camalexin production or indirectly by disrupting plant growth and the
28 auxin signals, or yet again by promoting SA biosynthesis through the isochorismate pathway.
29 This effect of BTH and its involvement in grapevine resistance would be worth investigating
30 further.

31 An inducer like BTH enhanced the resistance of treated tissues associated with the rapid
32 induction of two key enzymes in the phenylpropanoid pathway (PAL) and chalcone isomerase
33 (CHI) (Lawton *et al.*, 1996). However, in our study in grapevine leaves, *STS* transcripts were
34 up-regulated in both untreated and *En*-infected leaves at 48 and 72 hpi, leading to an increase

1 in total polyphenol content leaves. This demonstrates that the accumulation of these compounds
2 at this quantity was not able to interrupt pathogen growth. Commonly, stilbene levels can
3 discriminate cultivars that are susceptible or resistant to powdery mildew and they have been
4 used as a reliable resistance marker to assess resistance to mildews. However, studies have
5 described resveratrol and piceid as not being toxic, or only slightly, to *E. necator* and *P.*
6 *viticola*, and then only at high concentrations (Pezet *et al.*, 2004). In the present study, piceid
7 quantitation was as per amounts found in grapevine leaves treated with methyl jasmonate or
8 ethephon (Belhadj *et al.*, 2008), but the *trans*-resveratrol amount was three times lower than
9 expected. Moreover, pterostilbene alone was found in high concentrations in BTH-treated
10 leaves (whether inoculated or not), suggesting a role of this compound in growth inhibition of
11 pathogens, as indicated by Slaughter *et al.*, (2008) who suggested the involvement of
12 pterostilbene in resistance against downy mildew after induction.

13 After BTH treatment, *STS* transcripts were slightly up-regulated at 48 hpi, without any increase
14 in total polyphenol suggesting that the increase in stilbene was delayed. On the other hand, it
15 may be that the high BTH concentration used (1.9 mM) did not promote stilbene biosynthesis,
16 as suggested by Dao *et al.*, (2009) in *A. thaliana*, and that metabolization (methoxylation or
17 oligomerisation) of resveratrol occurred only in more toxic compounds, such as pterostilbene or
18 viniferin. The low or non accumulation of total polyphenols and the increase in pterostilbene
19 found in our study suggest the methoxylation of resveratrol or piceid, or the reavailability of
20 stored polyphenols. The early recognition of pathogens and the speed of synthesis or
21 metabolization of stilbenes, could be essential in defining the level of resistance against
22 mildews.

23 Concerning flavonoids which have been described as being induced only in resistant and
24 intermediate-resistant *P. viticola* cultivars (Dai *et al.*, 1995), *CHI* transcripts were rather
25 repressed in time after mildew infections with different isolates, so we hypothesize that the
26 trend for up-regulation of this gene after BTH treatment in *Pv*-infected leaves may also play a
27 role in inhibiting pathogen growth (Fig. 7). In conclusion, the effect of BTH on the
28 phenylpropanoid pathway seems rather complex since it involves up-regulation of key enzymes
29 in plants, and possibly enhancing flavonoid or specific stilbene accumulations.

30 The present findings provide insights into the potential use of transcripts and stilbenes as
31 markers of the defense status of grapevine leaves with or without elicitation or infection.
32 Altogether, they indicate that modulation of defense gene regulation is often more marked after
33 inoculation with isolates that are less sensitive to fungicides (*Pv*-R or *En*-B). This could be due
34 to the greater efficacy of grapevine defense on these phenotypes.

1 The different responses observed in infected leaves according to the isolates could be due to the
2 aggressiveness of isolates and also to the effector-triggered susceptibility of the plant, which
3 reduces its immune response to a resistance level that is insufficient to provide effective
4 protection against the pathogen attack. Indeed, without BTH treatment, the up-regulation of the
5 PR-protein genes in infected leaves seemed insufficient, suggesting a threshold of expression
6 necessary to protect the plant that is closely related to the activation of defense mechanisms, as
7 indicated by the induction of defense markers e.g. PR-proteins. It is likely that BTH conjugates
8 one over-expression of PR-protein transcripts with the production of pterostilbene, and that this
9 could be partially responsible for the efficacy of defense. Understanding the mechanisms and
10 possessing markers of grapevine resistance status will be a prerequisite for developing inducers
11 for integrated pest management in the vineyard.

12

13 **Acknowledgements**

14 This work was financially supported by the Bordeaux Wine Trade Council (CIVB) and INRA.
15 We are grateful to G. Taris and S. Gambier for their technical assistance, to L. De Bastard from
16 Syngenta for supplying acibenzolar-S-methyl, and to J. Coulter and R. Cooke for proof reading
17 the manuscript.

18

19 **References**

- 20 Ali K, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R, 2010. Metabolic constituents of grapevine and grape-
21 derived products. *Phytochemistry Review* **9**, 357-378.
- 22 Amrani L, Corio-Costet MF, 2006. Single nucleotide polymorphism (SNP) in β -tubulin gene
23 distinguishes two genotypes of *E. necator*: PCR assays from different symptoms in the
24 vineyard, *Plant Pathology* **55**, 505-512.
- 25 Belhadj A, Telef N, Cluzet S, Bouscaut J, Corio-Costet MF, Mérillon JM, 2008. Ethephon
26 Elicits Protection Against *Erysiphe necator* in Grapevine. *Journal of Agricultural Food*
27 *Chemistry* **56**, 5781-5787.
- 28 Bressan A, Purcell AH, 2005. Effect of benzothiadiazole on transmission of X-disease
29 phytoplasma by the vector *Colladonus montanus* to *Arabidopsis thaliana*, a new experimental
30 host plant. *Plant Disease* **89**, 1121-1124.
- 31 Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV, Paulin JP, 2000. Acibenzolar-S-methyl induces the
32 accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European*
33 *Journal of Plant Pathology* **106**, 529-536.

- 1 Campbell PA, Latorre BA, 2004. Suppression of grapevine powdery mildew (*Uncinula*
2 *necator*) by acibenzolar-S-methyl. *Vitis* **43**, 209-210.
- 3 Chen WJ, Delmotte F, Richard-Cervera S, Douence L, Greif C, Corio-Costet MF, 2007. At
4 Least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied*
5 *and Environmental Microbiology* **73**, 5162-5172.
- 6 Chong J, Le Henanff G, Bertsch C, Walter B, 2008. Identification, expression analysis and
7 characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and*
8 *Biochemistry* **46**, 469-481.
- 9 Corio-Costet MF, Dufour MC, Cigna J, Abadie P, Chen WJ, 2011. Resistance of *Plasmopara*
10 *viticola*: diversity and fitness of resistant isolates to QoI fungicides. *European Journal of*
11 *Plant Pathology* **129**, 315-329.
- 12 Dai GH, Andary C, Mondolot-Cosson L, Boubals D, 1995. Histochemical studies on the
13 interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris*, and *V.*
14 *Rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiological Molecular*
15 *and Plant Pathology* **46**, 177-188.
- 16 Dao TTH, Puig RC, Kim HK, Erkelens C, Lefeber AWM, Linthorst HJM, Choi YH, Verpoorte
17 R, 2009. Effect of benzothiadiazole on the metabolome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant*
18 *Physiology and Biochemistry* **47**, 146-152.
- 19 Debieu D, Corio-Costet MF, Steva H, Malosse C, Leroux P, 1995. Sterol composition of the
20 wine powdery mildew fungus: *Uncinula necator* sensitive or resistant strains to the sterol
21 biosynthesis inhibitor: triadimenol. *Phytochemistry* **39**, 293-300.
- 22 Dufour MC, Fontaine S, Montarry J, Corio-Costet MF, 2011. Assessment of fungicide
23 resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR
24 assays. *Pest Management Science* **67**, 60-69.
- 25 Fung RWM, Gonzalo M, Fekete C, Kovacs LG, He Y, Marsh E, McIntyre LM, Schachtman
26 DP, Qiu WP, 2008. Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the
27 transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiology* **146**, 236-249.
- 28 Friedrich L, Lawton K, Dincher S, Winter A, Staub T, Uknes S, Kessmann H, Ryals J, 1996.
29 Benzothiadiazole induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Journal* **10**, 61-70.
- 30 Giannakis C, Bucheli CS, Skene KGM, Robinso SP, Scott NS, 1998. Chitinase and β -1,3-
31 glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection,
32 *Australian Journal of Grape Wine Research* **4**, 14-22.

- 1 Gomes E, Coutos-Thevenot P, 2009. Molecular aspects of grapevine-pathogenic fungi
2 interactions. In: Roubelakis-Angelakis KA, ed. *Grapevine molecular physiology and*
3 *biotechnology* (2nd), Berlin, Springer-Verlag, 407-428.
- 4 Hamiduzzaman MM, Gabor J, Barnavon L, Neuhaus JM, Mauch-Mani B, 2005. Beta-
5 Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the
6 potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe*
7 *Interaction* **18**, 819-829.
- 8 Hukkanen A, Kokko H, Buchala A, Häyrinen J, Käenlampi S, 2008. BTH affects the leaf
9 proteome in arctic bramble (*Rubus arcticus*). *Molecular Plant Pathology* **9**, 799-808.
- 10 Iriti M, Rossoni M, Borgo M, Faoro F, 2004 Benzothiadiazole enhances resveratrol and
11 anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*.
12 *Journal of Agricultural Food Chemistry* **52**, 4406-4413.
- 13 Jacobs AK, Dry IB, Robinson SP, 1999. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in
14 grapevine infected with powdery mildew and treated with etephon. *Plant Pathology* **48**, 325-
15 336.
- 16 Lafon R, Clerjeau M, 1988. Downy mildew. In: Pearson PC, Goheen AC, eds. *Compendium of*
17 *grape diseases*, APS Press, Minnesota, USA, 11-13.
- 18 Lawton KA, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T, Ryals J,
19 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the
20 systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal* **10**, 71-82.
- 21 Legay G, Marouf E, Berger D, Neuhaus JM, Mauch-Mani B, Slaughter A, 2011. Identification
22 of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with *Plasmopara viticola*
23 through suppression subtractive hybridization (SSH). *European Journal of Plant Pathology*
24 **129**, 281-301.
- 25 Montarry J, Cartolaro P, Delmotte F, Jolivet J, Willocquet L, 2008. Genetic structure and
26 aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during grapevine powdery mildew epidemics.
27 *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 6327-6332.
- 28 Perazzolli M, Dagostin S, Ferrari A, Elad Y, Pertot I, 2008. Induction of systemic resistance
29 against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and
30 benzothiadiazole. *Biological Control* **47**, 228-234.
- 31 Pezet R, Gindro K, Viret O, Richter H, 2004. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene
32 on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* Roubelakis-
33 Angelakis K.A., ed, 145-148.

- 1 Pieterse CMJ, Van Loon LC, 2007. Signalling cascades involved in induced resistance. In:
2 Walters D, Newton A, Lyon G, eds. *Induced resistance for plant defence: a sustainable*
3 *approach to crop protection*. Blackwell, Oxford, UK, pp. 65-81.
- 4 Polesani M, Desario F, Ferrarini A, Zamboni A, Pezzoti M, Kortekamp A, Polverari, A, 2008.
5 cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected by
6 *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* **9**, 142-156.
- 7 Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST, 2006. An optimized grapevine RNA
8 isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR
9 during berry development. *BMC Plant Biology* **6**, 27-27.
- 10 Sappl PG, Onate-Sanchez L, Singh KB, Millar AH, 2004. Proteomic analysis of glutathione S-
11 transferase of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of
12 the plant (specific phi and tau classes). *Plant Molecular Biology* **54**, 205-219.
- 13 Slaughter AR, Hamiduzzaman MM, Gindro K, Neuhaus JM, Mauch-Mani B, 2008. Beta-
14 aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of
15 pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 185-195.
- 16 Sticher L, Mauch-Mani B, Metraux JP, 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of*
17 *Phytopathology* **35**, 325-370.
- 18 Trouvelot S, Varnier AL, Allegre M, Mercier L, Bailleul F, Arnould C, Gianniazzi-Pearson V,
19 Klarzynski O, Joubert JM, Pugin A, Daire X, 2008. A beta-1,3 glucan sulfate induces
20 resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses,
21 including HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **21**, 231-243.
- 22 Van Loon LC, van Strien EA, 1999. The families of pathogenesis analysis of PR-1 type
23 proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 85-97.
- 24 Walters D, Newton A, Lyon G, 2007. Induced resistance for plant defence: a sustainable
25 approach to crop protection. Blackwell, Oxford, UK, pp. 258.

26

27 **Figure legends**

28

29 **Figure 1:** Growth inhibition of the two isolates of *P. viticola* (Cou-15, *Pv-S*; Mic-128, *Pv-R*)
30 and the two isolates of *E. necator* (Llu41, *En-A*; Pv 74, *En-B*) after pre-treatment with BTH at
31 1.90 mM.

32

1 **Figure 2:** Schematic representation of pathways in which the different transcripts were
2 involved.

3
4 **Figure 3:** Relative gene expression in infected leaves with different isolates of *Plasmopara*
5 *viticola* (*Pv*) and *Erysiphe necator* (*En*), without (A) or with BTH pre-treatment (B). Each
6 column represents the time point after pathogen inoculation (24, 48 or 72 hpi) and each line
7 corresponds to one gene represented by a single row of boxes. The color scale bars represent
8 the ratio values corresponding to the mean of two independent experiments. Genes over
9 expressed appeared in red gradient color with expression level higher than 3 appeared in intense
10 red color, while those repressed appeared in blue gradient color with intensity lower than 0.3
11 appeared in dark blue (in white no change in gene expression compared to respective control
12 un-inoculated and without treatment at each time and at each foliar stage). In Fig. 3B, the
13 columns corresponding to BTH treatment alone represent the mean of the relative gene
14 expression of the different foliar stages of the two independent experiments.

15
16 **Figure 4:** Comparative expression profiles of 10 genes [PR-1 (A); PR-10 (B); PR-2 (C); PR-3
17 (D); PR-6 (E); PR-8 (F); STS (G); ANTS (H); LOX-9 (I); GST(J)] over three days in infected-
18 leaves after BTH pre-treatment 24h before inoculation. The log₂ normalized expression values
19 were plotted for each gene at three time points (24, 48, 72 hpi). Data correspond to the mean of
20 2 independent experiments for each *E. necator* isolate (N=2 *En*-A, (white triangle) and N = 2
21 *En*-B, (black triangle, dotted lines) and for each *P. viticola* isolate (N = 2 *Pv*-S (white square)
22 and N = 2 *Pv*-R (black square) of *P. viticola* isolates, full lines). Stars represent significant
23 values different from controls at the threshold of 0.05%. The expression is shown as the relative
24 expression of genes with control samples (untreated and un-inoculated). Bars represent a 95%
25 confidence interval calculated according to at least two technical replicates and two
26 independent biological experiments.

27
28 **Figure 5:** HPLC quantification of polyphenols in *Vitis vinifera* (L.) leaves in response to BTH
29 treatment after pathogen inoculations, or not. Results represent the means (\pm standard
30 deviations) of four experiments. Stars represent the significant values at the threshold of 0.05
31 %.

32
33 **Figure 6:** HPLC quantification of three stilbenes, (A) *trans*-piceid, (B) *trans*-resveratrol, and
34 (C) pterostilbene, in *Vitis vinifera* (L.) leaves in response to BTH treatment (1.90 mM), with or

1 without pathogen inoculations. Results represent the means (\pm standard deviations) of four
2 experiments. Stars represent the significant values at the threshold of 0.05 %. (\square) control; (\square)
3 BTH treatment; (|---) *Pv*-infected leaves; (\square) *En*-infected leaves; (\blacksquare) *Pv*-infected leaves and
4 BTH treatment; (\blacksquare) *En*-infected leaves and BTH treatment.

5
6 **Figure 7:** Relative gene expression in infected leaves with different isolates of *Plasmopara*
7 *viticola* (*Pv*) and *Erysiphe necator* (*En*), after BTH treatment with the gene expression found in
8 inoculated leaves as reference for calculating the relative expression. Each column represents
9 the time point after pathogen inoculation (24, 48 or 72 hpi) and each line corresponds to one
10 gene represented by a single row of boxes as described in Fig. 3.

11

1 Table 1: Characteristics of *P. viticola* and *E. necator* isolates.

2 ¹: famoxadone; ²: iprovalivarb; ³: mefenoxam. S=sensitive isolate, R=Resistant isolate.

Pathogen	Isolates	Locality of vineyard	Sampling year	Fungicide sensitivity		
				FAM ¹	I PRO ²	MEF ³
<i>P. viticola</i>						
<i>Pv-R</i>	MIC 128	Bordeaux	2005	R	R	S
<i>Pv-S</i>	COU 15	Bordeaux	2004	S	S	S
<i>E. necator</i>						
				Genetic group		
<i>En-A</i>	LLU 41	Pyrénées-orientales	2006	A		
<i>En-B</i>	PV 74	Pays de l'Aude	2006	B		

3

1 Table 2: Primer sets used for gene expression of grapevine.

2 ¹ The PCR efficiency of primers was: 0.97 for *EF1* γ ; 1.08 for *PAL*; 0.97 for *STS*; 0.84 for *LDOX* ;
 3 1.21 for *ANR* ; 1.10 for *CHI* ; 1.12 for *CHS* ; 0.88 for *PR1*; 1.03 for *PR10*; 1.18 for *PR2*; 1.14 for *PR3*; 1.23 for
 4 *PR6*; 1.05 for *PR8*; 0.96 for *PGIP*; 0.89 for *LOX*; 0.99 for *GST*; 0.86 for *ACC* ; 0.84 for *ANTS*; 1.05 for *CHORM*
 5 and 1.00 for *CHORS*".

Genes ¹	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	GenBank N°
Elongation Factor 1- γ Chain (<i>EF1</i> γ)	GAAGGTTGACCTCTCGGATG	AGAGCCTCTCCCTCAAAAGG	AF176496
Phenylalanine ammonia lyase (<i>PAL</i>)	ACAACAATGGACTGCCATCA	CACCTTCGACATGGTTGGTG	X75967
Stilbene synthase (<i>STS</i>)	ATCGAAGATCACCCACCTTG	CTTAGCGGTTCTGAAGGACAG	X76892
Leucoanthocyanidin dioxygenase (<i>LDOX</i>)	TGGTGGGATGGAAGAGCTAC	CCCACCTGCCCCATAGAAA	X75966
Anthocyanidin reductase (<i>ANR</i>)	CCTGCCTCCAAGACACTAGC	GGCCATCAGAGTAGGGATGA	VVI000166
Chalcone isomerase (<i>CHI</i>)	AGAAGCCAAAGCCATTGAGA	CCAAGGGGAGAATGAGTGAA	X75963
Chalcone synthase (<i>CHS</i>)	CCAACAATGGTGTCAGTTGC	CTCGGICATGTGCTCACTGT	X75969
PR protein class 1 (<i>PR1</i>)	CCCAGAACTCTCCACAGGAC	GCAGCTACAGTGTGTTCCA	AJ536326
PR protein class 10 (<i>PR10</i>)	GCTCAAAGTGGTGGCTTCTC	CTCTACATCGCCCTTGGTGT	AJ291705
β 1,3 glucanase (<i>PR2</i>)	GGGAGATGTGAGGGGTTAT	TGCAGTGAACAAAGCGTAGG	AF239617
Chitinase class IV (<i>PR3</i>)	TATCCATGTGICTCCGGTCA	TGAATCCAATGCTGTTTCCA	VVU97521
Serine protease inhibitor (<i>PR6</i>)	ACGAAAACGGCATCGTAATC	TCTTACTGGGGCACCATTTC	AY156047
Chitinase class III (<i>PR8</i>)	AATGATGCCAAAACGTAGC	ATAAGGCTCGAGCAAGGTCA	Z68123
Polygalacturonase inhibitor protein (<i>PGIP</i>)	CCGGGAAAATCCCATATTCT	AAGGTCCAACGACGTCAAAC	AF305093
Lipoxygenase 9 (<i>LOX</i>)	GACAAGAAGGACGAGCCTTG	CATAAGGGTACTGCCCGAAA	AY159556
Glutathione S- transferase (<i>GST</i>)	GGGATCTCAAAGGCCAAAACA	AAAAGGGCTTGGGAGTAAT	AY156048
1-aminocyclopropane, 1-carboxylic acid oxidase (<i>ACC</i>)	GAAGCCCTTTACGGGTCTC	CCAGCATCAGTGTGCTCT	AY211459
Anthranilate synthase (<i>ANTS</i>)	AAAAATCCAAGAGGGGTGCT	AAGCTTCTCCGATGCACTGT	XM002281597
Chorismate mutase (<i>CHORM</i>)	TCATTGAGAGGGCCAAATTC	AGGAGGCAGAAAAAGCATCA	FJ604854
Chorismate Synthase (<i>CHORS</i>)	GCCTTCACATGCAGATGCTA	CTGCAACTCTCCCAATGGTT	FJ604855

6

Table 3: Relative expression of defence-related genes that are significantly induced (**bold**) or repressed (underlined and *italic*) in leaves after pathogen inoculation in comparison with controls un-inoculated at the threshold of 0.05 %.

	<i>Plasmopara viticola</i> isolate						<i>Erysiphe necator</i> isolate					
	Fungicide Sensitive			Fungicide Resistant			Group A			Group B		
	24 hpi	48 hpi	72 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi
<i>PR1</i>	4.40	3.40	<u>0.63</u>	<u>0.42</u>	28.50	0.83	<u>0.07</u>	-	0.53	<u>0.04</u>	-	<u>0.26</u>
<i>PR2</i>	-	1.50	0.67	-	<u>0.34</u>	<u>0.13</u>	<u>0.04</u>	<u>0.19</u>	0.48	<u>0.03</u>	-	<u>0.38</u>
<i>PR3</i>	3.80	-	-	3.30	<u>0.25</u>	-	<u>0.05</u>	4.20	-	<u>0.08</u>	3.80	<u>0.13</u>
<i>PR6</i>	-	4.40	-	<u>0.42</u>	-	<u>0.40</u>	-	-	-	-	-	-
<i>PR8</i>	-	-	<u>0.50</u>	-	1.50	<u>0.19</u>	<u>0.17</u>	-	<u>0.34</u>	<u>0.06</u>	-	-
<i>PR10</i>	4.60	-	<u>0.71</u>	2.30	-	<u>0.50</u>	7.40	2.90	-	-	-	-
<i>PGIP</i>	<u>0.20</u>	-	<u>0.71</u>	2.00	<u>0.27</u>	-	<u>0.05</u>	-	-	<u>0.07</u>	-	-
<i>PAL</i>	-	-	-	-	2.50	-	-	-	-	-	-	-
<i>STS</i>	-	-	<u>0.36</u>	-	-	<u>0.38</u>	-	6.80	10.80	-	9.80	39.00
<i>CHI</i>	<u>0.01</u>	-	<u>0.11</u>	-	-	<u>0.45</u>	-	-	<u>0.34</u>	-	-	<u>0.01</u>
<i>CHS</i>	<u>0.02</u>	-	<u>0.28</u>	-	<u>0.21</u>	<u>0.25</u>	-	-	-	-	<u>0.20</u>	<u>0.67</u>
<i>LDOX</i>	<u>0.37</u>	<u>0.56</u>	<u>0.05</u>	<u>0.01</u>	7.05	2.00	<u>0.14</u>	<u>0.45</u>	2.40	<u>0.16</u>	3.90	3.60
<i>ANR</i>	2.10	1.70	-	-	2.30	1.30	1.50	<u>0.24</u>	-	1.50	<u>0.63</u>	-
<i>LOX</i>	1.70	-	0.08	-	15.50	<u>0.13</u>	<u>0.04</u>	-	<u>0.33</u>	<u>0.10</u>	12.40	1.50
<i>GST</i>	<u>0.57</u>	-	0.14	<u>0.26</u>	-	<u>0.40</u>	<u>0.20</u>	-	<u>0.77</u>	<u>0.09</u>	6.40	-
<i>ACC</i>	<u>0.01</u>	-	0.19	0.67	<u>0.31</u>	<u>0.50</u>	<u>0.08</u>	-	<u>0.18</u>	<u>0.11</u>	-	-
<i>ANTS</i>	0.00	3.20	<u>0.48</u>	0.00	1.60	-	0.00	-	-	0.00	1.70	-
<i>CHORM</i>	9.10	-	<u>0.67</u>	6.00	-	-	12.70	<u>0.36</u>	-	10.40	<u>0.37</u>	-
<i>CHORS</i>	-	-	-	-	4.60	-	-	-	-	-	-	-
% of differentiated genes	63.1	26.3	68.4	36.8	57.9	63.1	52.6	31.6	31.6	52.6	42.1	42.1
Relative % of down regulated genes	58.4	40	100	57.2	54.5	83.4	90	66.7	83.4	90	37.5	62.5

1 **Table 4:** Relative expression of defence-related genes that are significantly induced (bold) or
 2 repressed (underlined and italic) in BTH-treated leaves in comparison with controls un-
 3 inoculated at the threshold of 0.05 %.

4
5

	24 hpt	48 hpt	72 hpt	96 hpt
<i>PR1</i>	81.60	-	-	28.10
<i>PR2</i>	-	-	-	-
<i>PR3</i>	-	7.90	-	-
<i>PR6</i>	-	-	-	<u>0.21</u>
<i>PR8</i>	-	-	-	-
<i>PR10</i>	5.40	-	-	-
<i>PGIP</i>	-	<u>0.30</u>	-	-
<i>PAL</i>	-	-	-	-
<i>STS</i>	6.00	-	-	-
<i>CHI</i>	-	-	<u>0.31</u>	<u>0.09</u>
<i>CHS</i>	-	<u>0.33</u>	-	-
<i>LDOX</i>	-	-	2.10	-
<i>ANR</i>	-	-	<u>0.34</u>	-
<i>LOX</i>	16.40	-	-	<u>0.12</u>
<i>GST</i>	14.40	4.80	-	<u>0.42</u>
<i>ACC</i>	-	-	-	-
<i>ANTS</i>	-	-	-	-
<i>CHORM</i>	8.10	7.70	-	-
<i>CHORS</i>	9.10	-	<u>0.42</u>	<u>0.53</u>
% of differentiated genes	36.8	31.6	21	31.6
Relative % of up regulated genes	100	50	25	16

6
7

Table 5: Relative expression of defence-related genes that are significantly induced (bold) or repressed (underlined and italic) in BTH pre-treated leaves after inoculation in comparison with controls un-inoculated at the threshold of 0.05 %.

	<i>Plasmopara viticola</i>						<i>Erysiphe necator</i>					
	Fungicide Sensitive			Fungicide Resistant			Group A			Group B		
	24 hpi	48 hpi	72 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi
<i>PR1</i>	-	109.70	-	5.80	76.40	-	-	5.30	-	-	-	-
<i>PR2</i>	-	6.84	<u>0.03</u>	-	4.60	<u>0.49</u>	-	-	-	2.90	-	-
<i>PR3</i>	-	7.40	-	2.90	10.50	-	-	-	-	1.90	-	14.50
<i>PR6</i>	3.60	-	-	-	-	-	-	9.10	-	-	-	12.20
<i>PR8</i>	-	16.60	-	8.50	0.00	<u>0.25</u>	-	-	-	3.40	-	-
<i>PR10</i>	6.30	6.80	1.20	6.20	11.60	2.80	2.90	-	-	-	-	3.30
<i>PGIP</i>	<u>0.14</u>	-	-	<u>0.23</u>	-	-	-	-	-	<u>0.09</u>	-	<u>0.14</u>
<i>PAL</i>	<u>0.48</u>	-	-	-	-	<u>0.59</u>	-	-	-	-	-	-
<i>STS</i>	-	2.77	-	-	2.90	-	-	18.20	-	-	-	-
<i>CHI</i>	<u>0.01</u>	11.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.00
<i>CHS</i>	-	-	1.80	-	-	-	<u>0.71</u>	<u>0.59</u>	-	-	-	-
<i>LDOX</i>	<u>0.03</u>	-	-	<u>0.03</u>	-	-	0.50	2.80	-	-	-	-
<i>ANR</i>	<u>0.34</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>0.23</u>
<i>LOX</i>	-	2.21	<u>0.04</u>	-	3.70	<u>0.20</u>	<u>0.32</u>	-	-	<u>0.50</u>	-	5.80
<i>GST</i>	-	-	3.88	-	15.50	4.97	-	7.20	-	2.00	-	<u>0.32</u>
<i>ACC</i>	<u>0.20</u>	2.63	-	-	2.50	-	-	-	-	-	-	-
<i>ANTS</i>	<u>0.25</u>	5.60	-	<u>0.04</u>	3.00	-	<u>0.32</u>	-	-	11.80	-	14.30
<i>CHORM</i>	<u>0.18</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.90
<i>CHORS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>0.29</u>
% of differentiated genes	52.6	31.6	21.1	36.8	47.4	26.3	15.8	31.6	31.6	26.3	15.8	52.6
Relative % of up regulated genes	20	100	50	57.1	100	20	0	83.3	66.7	40	0	70

Figure 1

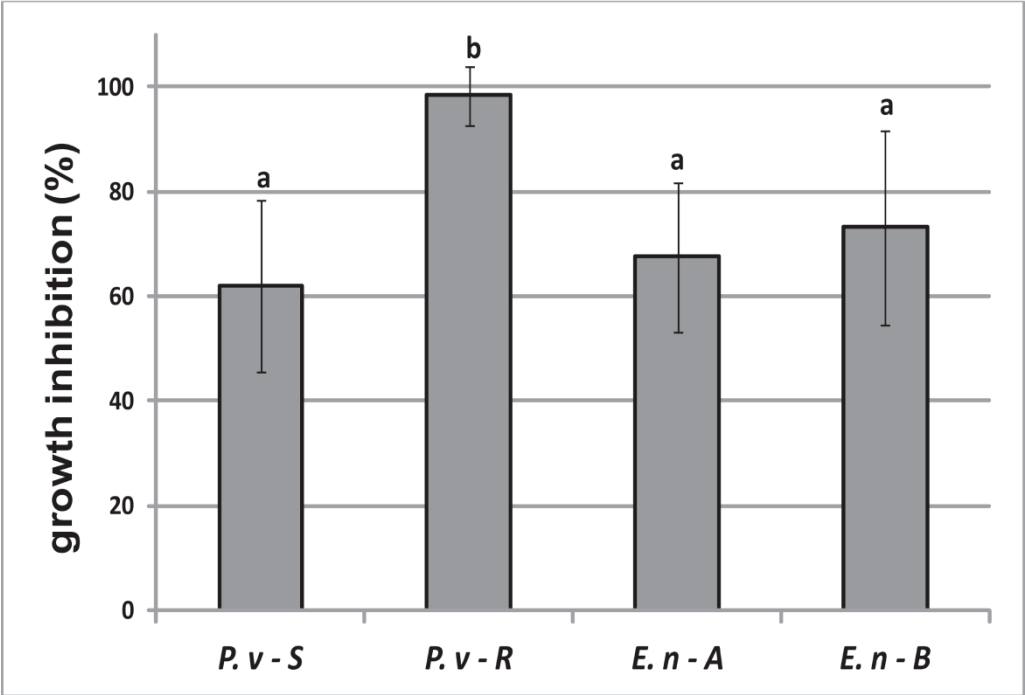


Figure 2

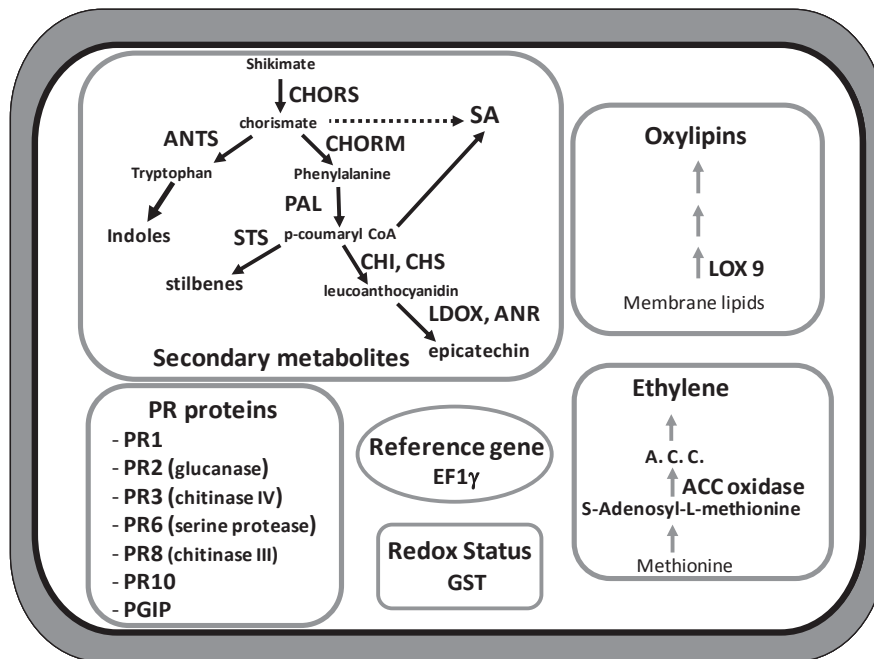


Figure 3

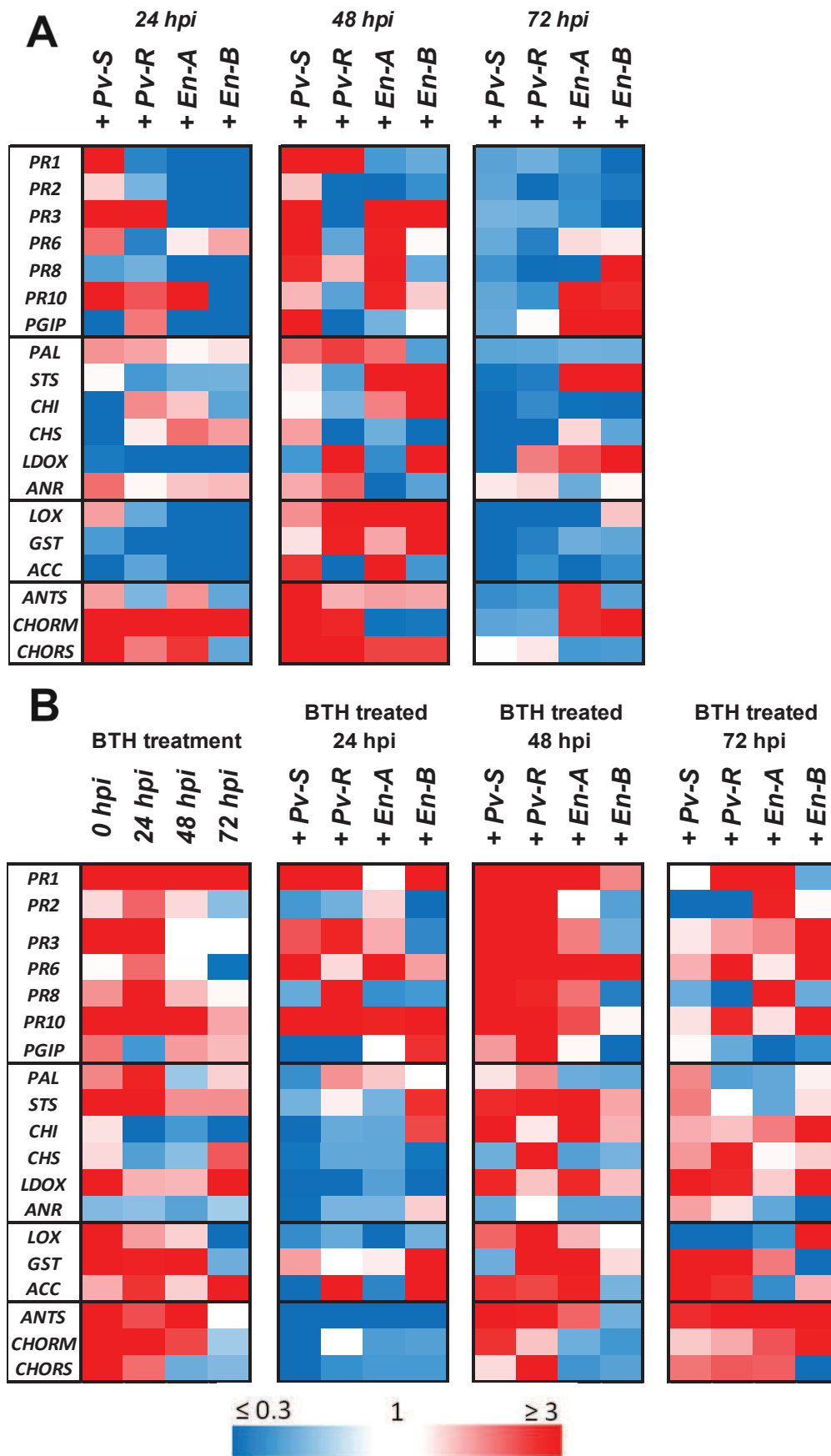


Fig 4

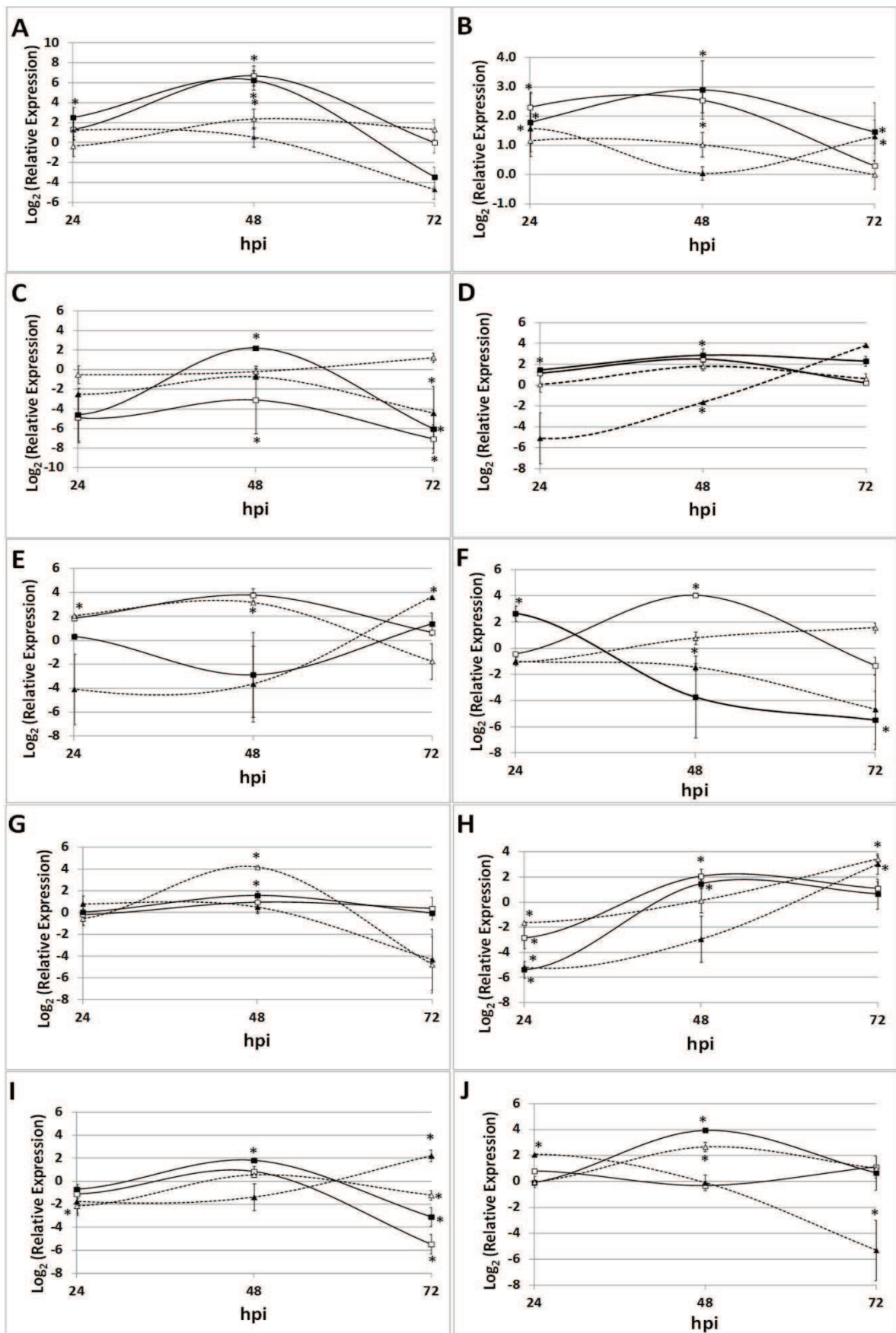


Figure 5

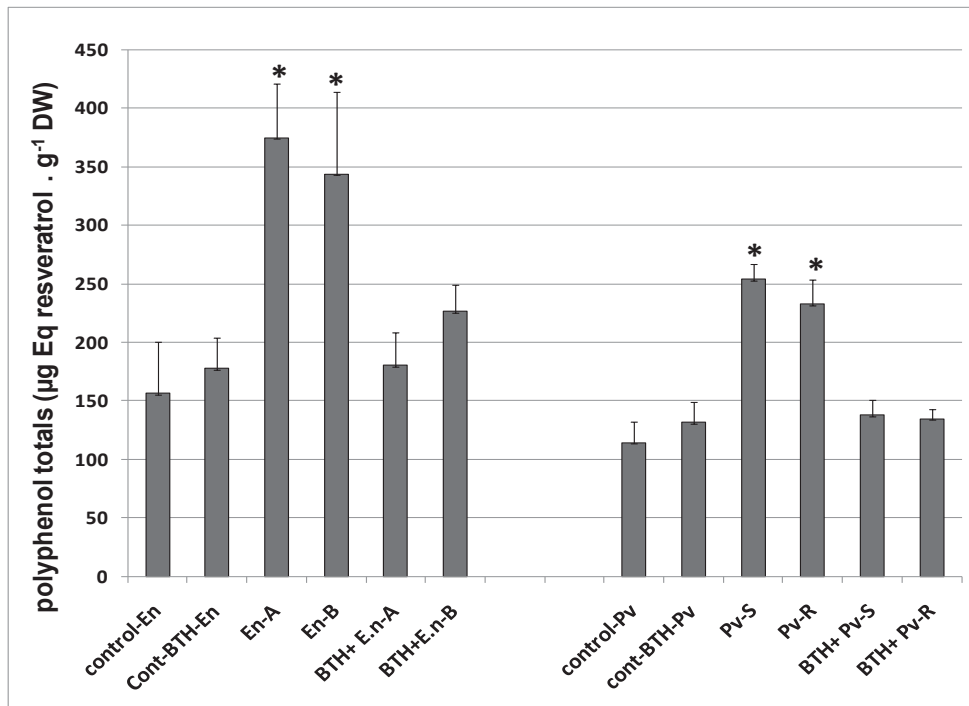


Fig. 6.

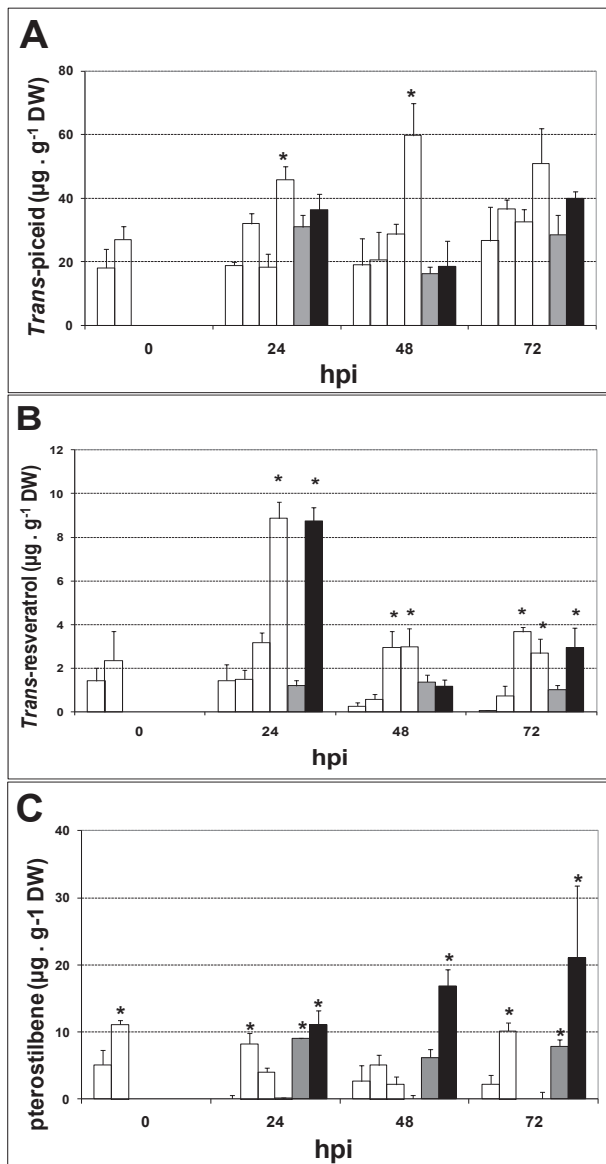
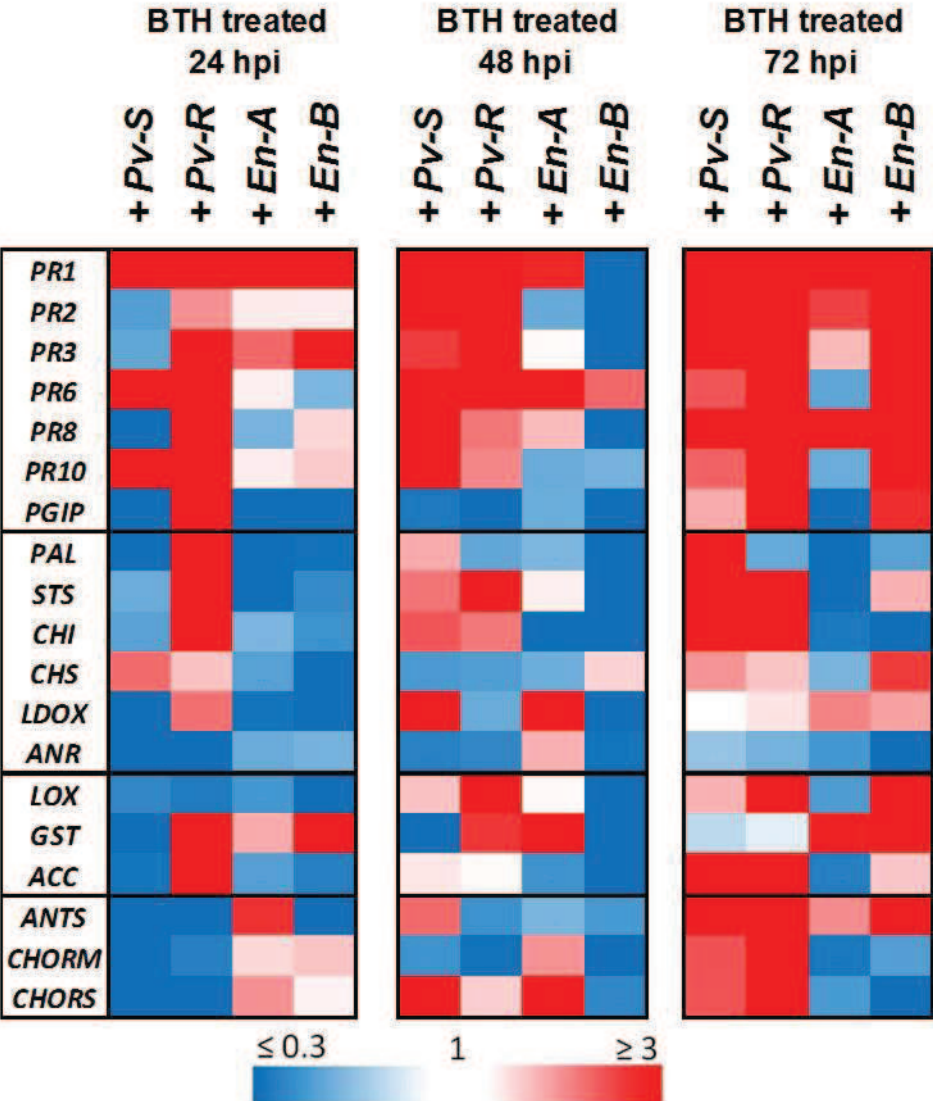


Figure 7



2.3. Fosetyl-Aluminium enhances disease resistance against powdery and downy mildew in grapevine (en preparation pour soumission dans Pest Management Science)

Marie-Cécile Dufour¹, Stéphanie Cluzet², Jean-Michel Mérillon² and Marie-France Corio-Costet^{1*}

¹ Institut National de la Recherche Agronomique, UMR Santé Végétale, CR Bordeaux, BP 81, 71 avenue E. Bourleaux, 33883 Villenave d'Ornon CEDEX, France.

² Institut des Sciences de la Vigne et du Vin- Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activités Biologiques, 210, chemin de Leysotte, CS 50008, 33882 Villenave d'Ornon.

Running title: Fosetyl-aluminium role in grapevine against downy and powdery mildew.

Key words: phosphonate, Fosetyl-Aluminium, chemical induced resistance, *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola*, gene expression.

ABSTRACT

Phosphites sold as fungicides or fertilizers have a complex mode of action against fungi involving both direct and indirect effects with a rapid and strong stimulation of plant defense mechanisms. The role of Fosetyl-aluminium was investigated in the enhanced resistance of grapevine leaves pre-treated in response to infection with different isolates of downy and powdery mildew (*Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*).

The grapevine leaf protection triggered by FOS, limiting the development of *E. necator* and *P. viticola* from 45% to 95% respectively, is directly correlated with the percentage of genes differentially up-regulated. Amongst a set of 19 defense-related genes studied, more than 36 % and 84 % of transcripts were differentially up-regulated in *E. necator* and *P. viticola* -infected leaves respectively. The grapevine responded by triggering up-regulations of pathogenesis-related protein genes (*PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR6*, *PR8*, *PR-10* and *PGIP*), genes involved in phenylpropanoid biosynthesis (*PAL* and *STS*) and involved in aromatic compounds biosynthesis pathways (*ANTS*, *CHORM* and *CHORS*). *PAL* and *STS* transcripts up-regulation was accompanied with a rapidly increase in total polyphenol and resveratrol contents just before pathogen challenges. Pterostilbene was specifically accumulated in pretreated leaves and associated with biological efficacy and significant increases of PR-protein transcripts.

1 INTRODUCTION

In their environment, plants are regularly subjected to attacks varied by pathogenic agents (fungi, bacteria and virus). However, the disease represents a situation of exception. During the evolution, plants set up mechanisms of defense allowing most of them to fight against the infections of the very numerous bioaggressors which include preformed physical and chemical barriers such as strengthening the cell wall and synthesis of antimicrobial molecules. However, some microorganisms are able to overcome the defense system and infect plant tissues. Control of plant diseases caused by these pathogens can be achieved through the selection of resistant varieties or by the use of antimicrobial compounds. Although susceptible plants possess the machinery necessary for resistance, it is not activated in sufficient magnitude or speed to restrict the infection.¹

The grapevine cultivated in Europe (*Vitis vinifera*) is subjected to the pressure of numerous bio aggressors among which of the obligate parasites such as the powdery and the downy mildew that attack all herbaceous parts of the plant and result in poor fruit set and poor fruit quality, resulting in significant economic losses.

Downy mildew caused by the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) is one of the most destructive grapevine diseases. This disease is present in many parts of the world. Primary infection begins with over-wintering oospores which germinate into motile zoospores that can actively locate stomata and start the infection process. Colonization involves intercellular mycelia growth and the differentiation of haustoria, which penetrate parenchyma cells but not breaking the plasma membrane².

The biotrophic fungus *Erysiphe necator* which causes powdery mildew on grapevine is a haploid heterothallic ascomycete. It produced wind-dispersed conidia on green which without sexual reproduction during grapevine growing season. It over-winters as mycelium within dormant buds that can reinitiate growth after bud break and colonize young flag shoots. It may also complete one sexual reproduction cycle in which cleistothecia are produced on bark of grapevine from which primary infections are initiated on susceptible tissues by released ascospores during the spring³.

With less than 3 % of total cultivated area in France, the vineyard consumes 20 % of pesticides marketed in France every year, among which 80 % are fungicides.⁴ The Ecophyto's plan 2018 aims in particular to reduce the dependence of farms to phyto-sanitary products, while maintaining a high level of quantity and quality production.

The use of stimulators of plant defenses, besides the plant breeding and the biological fight, represents an interesting alternative and/or complementary method of pest management.

Elicitor perception triggers the formation of ion fluxes, oxidative burst, protein phosphorylation, and the synthesis of signal molecules such as salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene.⁵ The signaling pathways induce defense-related genes leading to the reinforcement of plant cell walls, accumulation of antimicrobial compounds such as phytoalexins and synthesis of pathogenesis related-proteins.⁶

These inferred proteins, called pathogenesis related proteins (PR), locally accumulated in the site of the infection are classified in 17 different families.^{7,8} The PR proteins are described as being of good resistance markers inferred in some species of plant.

Phosphites sold as fungicides or fertilizers have a complex mode of action against fungi involving both direct and indirect effects with a rapid and strong stimulation of plant defense mechanisms⁹⁻¹³. The fosetyl-aluminum (aluminium tris (ethyl phosphonate)), a systematic fungicide used against diseases caused by Oomycetes, utilize this complex mode of action and was the object of numerous works on its role as inductor of phytoalexines^{11,14}.

Fosetyl-Al is hydrolysed in the plant to the phosphonate ion^{15,16}. Evidence that phosphonate inhibits mycelial growth of Oomycetes has been used to support the hypothesis that fosetyl-Al has a direct fungicide mode of action. The indirect mode of action hypothesis predicts that

phosphonates present in plants at insufficient concentrations to prevent mycelia growth induce physiological stress in the pathogen, causing it to elicit lethal host responses^{17,18}. The timing and magnitude of host defense responses is affected by phosphonates. Phosphonates alter the respiratory response of infected plants, and stimulate cytoplasmic and phytoalexin defenses of the host^{17,19-22}.

In this study, we examine the fosetyl-aluminium role and evaluate *in vitro* its ability to induce resistance in grapevine toward its two major bio-aggressors, *P. Viticola* and *E. necator*. The efficacy were assessed at different scales, biological (efficacy tests on growth), molecular (gene expression levels involved in defense responses) and biochemical (quantitative analysis of phenolic compounds and particularly stilbens).

After treatment of leaves with fosetyl, we monitored the expression of defence-related genes encoding for enzymes involved in the phenylpropanoid pathway (*PAL*, *STS*, *CHI*, *CHS*, *LDOX*, *ANR*) encoding to PR proteins (*PR1*, *PR10*, *CHIT3*, *CHIT4c*, *PIN*, *PGIP*, and *GLU*), involved in the oxido reduction system (*GST*), in the ethylene or oxylipine pathways (*ACC* and *LOX* respectively) and others involved in the indole pathway (*ANTS*, *CHORM* and *CHORS*) by real-time quantitative polymerase chain reaction (RTq-PCR). We performed too quantitative analyses of stilbenes, the major antimicrobial compounds of grapevine, to check for a correlation between the level of gene expressions involved in the biosynthesis of stilbenes and the accumulation of these polyphenols.

The present study sought to elucidate the role played by FOS as an elicitor on infected grapevine leaves, and to identify defence markers specific or not of pathogen variability (intra or inter species). Kinetics of transcript profiles of selected defence-related genes during *Vitis vinifera*-biotrophic pathogen interaction were characterized, and the impact of pathogen diversity was investigated in the absence or presence of FOS elicitation. The relationship between transcript profiles, polyphenol contents and pathogen control should contribute to understanding the basics of the behaviour of grapevine after elicitation with FOS and its ability to enhance its defenses when subjected to various pathogens. Grapevine protection with fosetyl against downy and powdery mildew (*Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*) was evaluated on detached leaves.

2 EXPERIMENTAL METHODS

2.1 Materials and methods

2.1.1 Plant and fungal materials

Grapevine plants (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) were propagated from woodcuttings in a greenhouse. After three weeks, rooted cuttings were potted in a sandy soil and were grown under controlled conditions at 25/20°C day/night temperature, with 75% relative humidity, a 16-h photoperiod with fertilization every week (2g.L⁻¹, N-P-K 20 % with trace elements). Two-month-old plants with 10-12 leaves were used for the experiments, and the third and fourth leaves at their apex were used for powdery and downy mildew inoculations, respectively.

Plasmopara viticola: A fungicide-sensitive isolate and a fungicide-resistant isolate from the laboratory monospore collection were multiplied on grapevine leaves and inoculated as described in Corio-Costet *et al.*, (2011) (Table 1), with spore suspension at 5000 sporangia.ml⁻¹ by 15 µl drops per leaf, and incubated for 7 days at 22°C with a 16-8 hr photoperiod.

Erysiphe necator: Powdery mildew isolates (one belonging to group B and one to group A), (Table 1) were inoculated under sterile conditions on decontaminated grape leaves, as

previously described (Debieu *et al.*, 1995) by blowing spores from sporulating leaves (1000 conidia per cm² of leaf), and were incubated for 12-14 days at 22°C with a 16-8 hr photoperiod.

2.1.2 Leaf treatment with FOS and inoculation with pathogens

Fosetyl-Al (aluminium tris (ethyl phosphonate)) was dissolved in water and sprayed onto leaves at the concentration of 1.13 mM, 24 h before inoculation with the different pathogens. The experimental protocol for each sampling time point (0 hpi, 24 hpi, 48hpi, 72 hpi) corresponded to six untreated leaves and six FOS-treated leaves that were inoculated or not with each of four isolates used during this experiment. For each sampling point, six half leaves were used for biochemical analysis and the six other half leaves were used for gene expression. In addition, six other leaves treated with FOS or not were inoculated to confirm the biological efficacy of FOS treatment. The development of the disease was assessed 7 days after downy mildew inoculation or 12 days after powdery mildew inoculation. Disease intensity was estimated by measuring growth and intensity of fungal mycelium and sporulation, as described previously^{23, 24} (Corio-Costet *et al.*, 2011, Debieu *et al.*, 1995), and was expressed as the mean \pm standard deviation of the six replicates. For biological, biochemical and gene expression assays, two independent experiments were carried out over the period. All data were subjected to analysis of covariance by general linear model using the statistical programme Systat 11 (Systat Software, Inc) and significant differences were determined by Tukey's honest significant difference (HSD) test at the level of $P \leq 0.05$.

2.1.3 Expression experiments and q-RT-PCR

A series of 20 genes was monitored by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) by using the γ -chain elongation factor 1 gene (*EF1- γ*) as internal standard to normalize the starting template of cDNA (Table 2). This gene was used because it is not involved in plant response to infections, unlike α -tubulin or actin genes²⁵ (Polesani *et al.*, 2008), and because it is very stable with mean C_q values of 20.32 ± 0.061 ($P=0.531$). Treatment, infection or both had no effect on the C_q values of the *EF1- γ* gene.

Sprayed leaves in each experimental condition were removed at all time points and frozen at -80°C. Each sample resulted from a mixture of six half leaves from which the mRNA was extracted, and technical duplicates or triplicates were performed. *In fine*, the data are the average of duplicates of at least two independent experiments for the 20 genes.

Primers were designed at 60°C T_m to amplify fragments from 75 to 150 bp using primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Table 2). RNAs were extracted according to the method of Reid *et al.*, (2006).²⁶ Only high quality RNA samples were selected, with an absorbance ratio at 260/280 nm ranging from 1.82 to 2.06 (1.86 ± 0.065). Two μ g of RNA treated by DNase I (RQ1 Rnase-free Dnase, Promega, France) were reverse-transcribed using 2 μ M oligo d(T)₁₅, ribonuclease inhibitor and M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, France) in compliance with the manufacturer's instruction.

The amplification specificity of each qRT-PCR was reinforced by a single peak in melt curve analysis, and no primer was detected. Thereafter, the expression of the selected genes was assessed by using a CFX 96 system thermocycler (Bio-Rad France, Ivry sur Seine) with SYBR[®] Green to detect dsDNA synthesis. For each reaction, 1 μ l of each primer at 1 μ M, and 7 μ l of 2X- Blue SYBR Green fluorescein Mix including Hot start DNA polymerase, dNTP and MgCl₂ (Abgene, France) and 5 μ l of cDNAs, were used in compliance with the manufacturer's instructions. The cycling conditions were: denaturation cycle (94°C for 15 min); amplification and quantification cycle repeated 40 times (94°C for 10 s, 55°C for 10 s,

72°C for 20 s). Expression ratios for each cDNA were calculated for each time point relative to control leaves at the same time. Relative gene expression was obtained with the formula: fold induction = $2^{-[\Delta\Delta Cq]}$, where $\Delta\Delta Cq = [Cq \text{ GI (unknown sample)} - Cq \text{ EF1}\gamma \text{ (unknown sample)}] - [Cq \text{ GI (reference sample)} - Cq \text{ EF1}\gamma \text{ (reference sample)}]$. GI is the gene of interest, and EF1 γ is the grapevine Elongation Factor1 γ gene used as the internal control. The reference sample chosen for normalization represented 1-fold the expression of the gene of interest (e.g., control leaves untreated and uninoculated). The mean values obtained by this calculation method varied from 0.01 to 109.7 (the $\Delta\Delta Cq$ corresponding means ranged from -6.65 to 6.78). The values of $\Delta\Delta Cq$ included between 0 and 1 correspond to repressions, so we performed variable transformations ($= -1 / x$) in order to have a scale equivalent to the positive data. Each sample was assayed at least in duplicate in each independent experiment. To ensure correct normalization in real-time PCR, amplification efficiencies should be similar. Each PCR system was tested with cDNA samples that were serially diluted 1:10 with distilled water. Amplification efficiencies should be determined from the slope of the log-linear portion of the calibration curve. Specifically, PCR efficiency = $10^{-1/\text{slope}} - 1$, when the logarithm of the initial template concentration of known cDNA amounts (the independent variable) is plotted on the x axis and Cq (the dependent variable) measured by the CFX 96 system software (Bio-RAD, Hercules, CA, USA) is plotted on the y axis. The dissociation curves for each amplicon were then analyzed to verify the specificity of each amplification reaction. The dissociation curve was obtained by heating the amplicon from 60°C to 95°C (data not shown).

Means of relative expression obtained in control and other treatments and/or inoculations were compared with the analysis of variance using Tukey's post hoc test. Statistical analyses were carried out using the Systat 11 programme (Systat Software, Inc).

2.1.4 Extraction and quantification of stilbenes

Stilbenes were extracted from each sample (80) of dried leaves (100 mg) overnight with 20 ml methanol as described previously (Belhadj *et al.*, 2008) obtained from the gene expression experiment (see below). Two independent experiments were performed. Analysis of stilbenes was carried out by HPLC on a 250 × 4 mm Prontosil Eurobond C18 reverse-phase column (4.0 ID X 250 mm, 5 μ m) (Bischoff Chromatography, Leonberg, Germany). Separation was carried out at a flow rate of 1 ml/min with a modified mobile phase composed of (A) H₂O: TFA 1% (97.5/ 2.5, V/V) and (B) ACN: A (80/20, V/V). The run was set as follows: 0 to 5 min, from 10%B to 20% B; 5 min to 19 min, 20% B to 25% B; 19 to 20 min, 25% B to 30% B, 20 to 35 min, from 30%B to 40% B; 35 to 50 min, 40% B; 50 to 55 min, from 40% B to 60% B; 55 min to 56 min, from 60% B to 100%B, 56 to 60 min, 100% B; 60 to 62 min. Fluorimetric detection was performed at $\lambda_{ex} = 300$ nm and $\lambda_{em} = 390$ nm, and stilbene contents were estimated from specific calibration curves as described in Belhadj *et al.*, 2008. Data were expressed as the means (\pm standard deviations) of at least four quantifications. Statistical analysis was carried out using Newman-Keuls or Student *t*-tests at level of $P \leq 0.05$.

3 RESULTS

3.1 Fosetyl protects grapevine against *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*

For the studies of transcript and polyphenol content, leaves were pre-treated with 1.13 mM of FOS, 24 hours before inoculation with the different mildew isolates (Table 1).

The results in Fig.1 show that grapevine leaves treated with 1.13 mM of FOS resulted in a reduction of disease symptoms compared with control leaves. The reduction in disease severity was estimated as the percentage of fungi growth inhibition. The percentage of *P. viticola* growth suppression was 92.95% and that of *E. necator* was 45.85 %.

Globally, FOS induced an inhibition of 92.56 ± 11.02 and 93.33 ± 9.85 % on the *P. Viticola* isolates (*Pv-S* and *Pv-R* respectively). On *E. Necator*, FOS induced a significant lower inhibition than *P. viticola* with 42.5 ± 12.88 % and 49.19 ± 19.26 % on *En-A* and *En-B*, respectively.

3.2 Transcript profiles reveal specific responses of the grapevine depending on the species of biotrophic pathogen.

V. vinifera is especially susceptible to mildew. To explore compatible interaction with different obligate pathogens, a comparison in time of transcript profiles of selected genes of leaves infected with two isolates of *P. viticola* (Mic-128: *Pv-R* and Cou-15: *Pv-S*) and two isolates of *E. necator* (Llu-41: *En-A* and Pv74: *En-B*) was carried out (Table 2). The grapevine defenses were measured by transcript kinetics at 24, 48 and 72 hours post-inoculation (hpi) and completed by biological efficacies at 8 or 12 dpi (see above). The gene set used included PR proteins, some genes involved in the phenylpropanoid pathway, others involved in the oxido reduction system, in the ethylene or oxylipine pathways and others involved in the indole pathway (Table 2, Fig. 2).

At 24 hpi, the transcript analysis in grapevine leaves pointed to a down-regulation of genes with 57.2 to 58.4% of the differentially -expressed transcripts significantly down-regulated in *P. viticola*-infected leaves, and 90% in *E. necator*-infected leaves (Fig. 3A, Table 3). In *Pv*-infected leaves, some transcripts were up-regulated in the presence of two *P. viticola* isolates, such as *PR-3* and *PR-10*. However, transcript profiles also varied depending on the isolate and the genes under consideration (e.g. *PR-1*, *PR-6*, *CHI* and *CHS*). Indeed, in leaves infected with *P. viticola* fungicide- sensitive isolate (*Pv-S*), genes involved in the phenylpropanoid pathway (*CHI* and *CHS*) were strongly repressed, whereas in *Pv-R* infected leaves, it was the *LDOX* gene coding for enzyme situated more in down-stream of the pathway which was specifically repressed. In *En*-infected leaves, the PR-protein transcripts (*PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR-8* and, *PGIP*) were generally significantly down-regulated.

Only four genes behaved in a similar way whatever the pathogen 1 considered: *LDOX* (polyphenol pathway), *ACC* (ethylene pathway), and *GST* (oxidative stress response system) transcripts which were all repressed, and the *CHORM* (indole pathway) transcript which was up-regulated.

At 48h hpi (Fig. 3A, Table 3), most of the grapevine transcripts were not affected significantly in *Pv-S* and *En-A*-infected leaves (26.3% and 31.6% of differentiated genes, respectively). By contrast, in *En-B* and *Pv-R*-infected leaves, 42.1 to 57.9% of transcripts were either down or up-regulated. In *Pv*-infected leaves, some PR- protein transcripts were up-regulated such as *PR- 1*, *PR-2*, *PR-6* and *PR-8*) depending on the isolate under consideration, while in *En*-infected leaves only *PR-3* was over-expressed. A peculiarity of *En*-infected leaves was the accumulation of *STS* transcripts and the repression of *ANR* and *CHORM* transcripts (Table 3). By contrast, an up-regulation of *ANR* and *ANTS* transcripts was specific to *Pv*-infected leaves.

At 72 hpi, the majority of differentiated transcripts (83.4 to 100 %) in *P. viticola*-infected leaves were down-regulated, with significant down-regulation of transcripts of the phenylpropanoid pathway (*STS*, *CHI* and *CHS*), PR-proteins, *LOX*, *GST* and *ACC* (Fig. 3A, Table 3). In *E. necator*-infected leaves, the down-regulation was also high with 62.5 to 83.4% of differentiated transcripts affected, with *CHI* and *PR-1*, *PR-2* commonly repressed. Only the

LDOX gene was over-expressed in *En*-infected leaves, suggesting the possibility of metabolic flow towards flavonoid biosynthesis.

3.3 Effect of Fosetyl treatment on defence-related gene expressions in un-inoculated leaves

Grapevine leaves were challenge with FOS and with or without pathogen infections. The expression of 19 genes selected for their involvement in grapevine defence responses was followed by real time quantitative polymerase chain reaction (RTq-PCR) using the γ -chain of Elongation Factor 1 gene as internal standard (Table 2). To evaluate the stimulating effect of grapevine defences, gene expressions were measured during three days after pathogen inoculations. The gene set included PR-proteins, some genes involved in phenylpropanoid pathway, others involved in oxido reduction system, in ethylene or oxylipine pathways or involved in indole pathways.

In time, 15.8 to 68.4 % of transcripts were affected, mainly at 24 and 48 hpt (42.1 and 68.4 % respectively, Table 3) with up regulation of PR proteins (*PR1*, *PR3*, *PR8*, *PR10* and *PGIP*), of genes coding for the two key enzymes involved in phenylpropanoid pathway (*PAL* and *STS*) as the *GST* and *LOX* genes and *ANTS*, *CHORM* and *CHORS* genes, involved in indole pathway.

During the three days, the up-regulation on differentiated transcripts progressively decreased from 100 to 0%.

3.5 Defence-related genes expressions in FOS-pretreated grapevine leaves inoculated with *P. viticola* or *E. necator*

In time, in *Pv*-infected leaves, 42 to 100% of genes were differentiated (Table 3). At 24 hpi, down regulations, involved in flavonoid (*CHI* and *LDOX*) and indole (*CHORM*) pathways and up-regulation of PR proteins (*PR2*, *PR3*, *PR10* and *PGIP*) as well as *GST* were observed (Table 4). At 48 hpi, 47.4 % of genes were significantly modulated with 66.7 % of up-regulation concerning PR proteins (*PR2*, *PR10* and *PGIP*), genes involved in flavonoid (*CHI* and *CHS*) and indole pathways (*ANTS*). At 72 hpi, 100% of genes were differentiated with 84.2% up-regulated.

In *En*-infected leaves, 10.5 to 47.4 % of studied genes were significantly modulated. At 24 hpi, 47.4 % of genes were mainly up regulated (77.8%), principally coding for PR proteins (*PR2*, *PR3*, *PR8*, *PR10* and *PGIP*) as were *LDOX* and *CHORM*. At 48 hpi, 10.5 % of genes were differentially regulated with only *PR2* gene up-regulated and *LOX* gene down regulated. At 72 hpi, 36.8% of genes were significantly regulated and all of them were up-regulated coding for PR proteins (*PR2*, *PR3*, *PR6* and *PR10*) or *CHI* and *ANTS* genes, involved in flavonoid and indole biosynthesis pathways respectively.

The means of relative gene expressions during the three days showed 11 genes on 19 were more than 3 times up regulated in downy mildew defence response and only 6 genes were over expressed in powdery mildew's (Figure 2). Among these results, 7 genes were significantly up-regulated (36.8 % of differentiated genes) in downy mildew interaction against 2 genes significantly over expressed in powdery mildew defence response (10.5 % of differentiated genes). The grapevine leaf protection triggered by FOS against *P. viticola* and *E. necator* is directly correlated with the percentage of gene differentially up-regulated (Figure 3). More than genes were up-regulated, more than the grapevine will be protected.

3.5 Effect of FOS treatment on phytoalexins and polyphenol accumulations in grapevine

The polyphenol content and the *trans*-form content (the main form found in leaves) of three major stilbenic phytoalexins, resvetrol, piceid and pterostilbene were quantified during 72 hours after pathogen inoculation with or without BTH pre-treatment (Figures 4 and).

In FOS treated leaves, the polyphenol content was significantly accumulated during the 72 hours analysis (mean of $310.05 \pm 35.09 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves), with an increase of 2.6 fold than in control leaves ($120.8 \pm 9.98 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves) . In downy and powdery mildew challenges, a significant accumulation of phenolic compounds occurred leading to an increase of 2 and 3 time more than in control, (243.4 ± 12.1 and $359.3 \pm 40.3 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves respectively). Significant accumulations were observed in FOS pre-treated leaves after downy and powdery mildew inoculations, with an increase of from 2.2 to 3.3 fold more than in control, respectively (392.5 ± 43.6 and $269.4 \pm 42.9 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves respectively).

Over time, *trans*-piceid was quantitatively the most prolific stilbene produced in grapevine leaves (Fig 5A et 6A).

In downy mildew experiments, control leaves contained 11.4 to 31.5 μg of *trans*-piceid per g of dried leaves and in these of powdery mildew, control leaves contained from 8.0 to 43.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves. Piceid accumulation was significantly observed after powdery mildew inoculations (45.8 to 59.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves). FOS treatment at 0, 24 and 48 hpi only in powdery mildew leaves (between 27.3 and 54.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried weight) and in FOS treated and *En* infected leaves (16.8 to 50.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves) (Figures 5 and 6). No *trans*-piceid significant accumulation was observed after *Pv* inoculations compared to control leaves. FOS treatment with or without pathogen inoculations in downy mildew leaves.

The *trans*-resveratrol content was very low in control grapevine leaves (0.01 to 1.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves). Globally, the content increased significantly after downy and powdery mildew inoculations (from 2.7 to 8.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves). FOS treatment at 0, 24, 48 and 72hpi increased also the content of resveratrol in leaves (from 3.9 and 4.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried weight in *En*-leaves or from 3.5 and 3.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried weight in *Pv*-leaves). In similar way, FOS treatment increased its content in *Pv* and *En* infected leaves, 48 and 72 hpi (from 2.0 to 3.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried weight).

Pterostilbene was more abundant in *Pv*-leaves ($4.21 \pm 0.84 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves) than in *En*-leaves ($0.65 \pm 0.37 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves). But at relatively lower levels compared to the quantity of the other phytoalexins. A significant accumulation was observed only in leaves FOS-treated 72 hours after downy mildew inoculation ($18.6 \pm 0.56 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves).

4 DISCUSSIONS

The biological or chemical mechanisms of induced resistance by Fosetyl-aluminium have rarely been analyzed, while the importance of the induced molecules related to resistance has been well documented^{5,6}.

The present study reveals that Fosetyl-Aluminium, a phosphonate derivative which is largely reported as effective against Oomycetes¹⁵⁻²¹, was also effective against an ascomycete *E.nector*. In these *in vitro* experiments, FOS treatment on grapevine leaves resulted in a protection to *P. viticola* and *E. necator* with fungal development reduced of 92.95 % for *P. viticola* compared to untreated leaves. FOS was also able to limit the growth of *E. necator* but only at 45.85 %.

Fosetyl treatment induced changes at transcriptional level and phytoalexins content depended on sampling time, and on the pathogen. The transcript analysis of defence-related genes over three days informed us as to the potential defence pathway required during the SAR response. The PR-protein transcripts (*PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR6*, *PR8*, *PR 10* and *PGIP*), stilbene pathway (*PAL* and *STS*), *LOX* and *GST* as well as genes involved in indole pathway (*ANTS*, *CHORM* and *CHORS*) were strongly up-regulated in leaves treated with 1.13 mM of FOS.

The main role of these PR proteins is to limit pathogen activity and growth. The identification of the PR-2 family as β -1,3-endoglucanases and the PR-3, -4, -8, and -11 as endochitinases, as well as the PR-6 family as proteinase inhibitors, which could act against fungi. The correlation of β 1-3 glucanase (*PR2*) and chitinase (*PR3* and *PR8*) activities with pathogen resistance has been well reported and both are thought to support defence against downy and powdery mildew²⁷. *PR2* proteins are probably the most important pathogenesis-related (PR) proteins related to resistance to downy mildew.²⁸ In tobacco, PR protein induction is associated with SAR and particularly the class III chitinases represent one of a subset of PR proteins induced (*PR8*).²⁹ Chitinase genes are constitutively expressed in resistant plant whereas β 1-3 glucanase (*PR2*) was exclusively expressed after fungal challenge.³⁰

Since cell walls of *P. viticola* consist of chitin and glucans, the over expression of genes encoding for enzymes as β ,1-3 glucanase or chitinase may inhibit fungal growth by degrading cell walls of the pathogen. This degradation provides fragments of cell wall, which could play as elicitors the activation of another plant defence response.

The PR1 family has been associated with activity against oomycetes. PR-1 and PR-10 proteins are often used as markers of the defense status of plant state conferred by pathogen-induced systemic acquired resistance (SAR), but their biological activity has remained elusive. The biological function of PR10 is not known, nevertheless, its transcript accumulation was observed after fungal challenge. In our study, we observed transcript accumulation of PR10 in leaves primed by FOS with or without fungal challenge.

Our results confirmed that FOS had an indirect effect by enhancing grapevine systemic acquired resistance, before and after pathogen challenges in susceptible cultivar Cabernet Sauvignon, in agreement with work previously describes, which found *PR-1* induced, or not, in infected-leaves of susceptible cultivars.^{31,32}

The signal transduction pathway through SA accumulation is found in the systemic acquired resistance (SAR with *PR1*, *PR2*) induced by pathogen attack³³ while it is thought that JA and ET are the signal transduction molecules for induced systemic resistance (ISR with *PR3* and *PR4*).

The foseyl treatment led to up regulation of all of studied genes coding for these major PR proteins in downy and powdery mildew defense responses over the three days. This suggests that the SA and JA/ET signaling pathways play an important role in mode of action of Foseyl in *Vitis vinifera* in agreement with the dual mode of action (direct and indirect). Its direct action against pathogens leads to the pathogen degradation, releasing PAMPs (Pathogen associated Molecular patterns) recognized by the plant basal immune system. Secondly, by its indirect effect, FOS is able to stimulate the systemic acquired resistance by SA and JA/ET signaling pathways. It's the first work that is able to specify more clearly the mode of action of FOS in grapevine defense stimulation.

After FOS treatment, PAL and STS transcripts were slightly up regulated 24 and 48 hours after treatment accompanied with a rapid increase in total polyphenol and resveratrol contents just before pathogen challenges. Our results are in accordance with those Nemestothy and Guest.¹³ The enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL), the first enzyme involved in phenylpropanoid biosynthesis, is activated earlier in treated plants.²⁵

Pterostilbene, the methoxylated form of resveratrol, is a toxic as viniferin against *P. viticola*, was only identified in samples in response to downy mildew infection. The present results showed that plants treated with foseyl-Al induced low levels of pterostilbene in grapevine leaves compared to the content found after other treatment, while a higher accumulation of these compounds was observed after inoculation with *P.viticola*.

The localization of stilben phytoalexins at the infection sites as well as their concentrations and the time-rate of their synthesis contribute to the establishment of resistance mechanisms

in grapevine.³⁴ Stilbens, and particularly viniferins, are strongly implicated in the resistance of grapevine to powdery mildew. In resistant cultivars, resveratrol is rapidly polymerized into viniferins which have an effective toxic effect toward the pathogens. These compounds are typically produced in leaves and berries of grapevine, in response to stresses, which include fungal infection, UV irradiation, and induction by chemicals.³⁵ It could be important to note that viniferins were never identified in the samples in grapevine defense response to downy or powdery mildew infections, in our experiments.

Data, expressed per dried weight, seem to be in contradiction with the hypothesis that stilbens, and particularly viniferins, are strongly implicated in the resistance of grapevine to powdery and downy mildews, because we observed that its accumulations occurred after pathogen challenge with or without FOS treatment. Our results were in accordance to Pezet *et al.*,³⁶ because the response of the pathogen inoculation leads to a rapid stilbene synthase induction and an important resveratrol synthesis maintained after infection. Romero-Perez *et al.*,³⁷ have shown that the concentration of resveratrol and piceid in grape berry skins of susceptible cultivars of *V. vinifera* increased with the level of infection in the vineyard and thus demonstrated that the only accumulation of these compounds is not able to interrupt the pathogen growth.

Moreover, pterostilbene alone was found in high concentrations in FOS treated leaves 72 hours after *P. viticola* infection, suggesting a important role of this compound in growth inhibition of this pathogen. Similarly, Slaughter *et al.*,³⁸ pointed to the involvement of pterostilbene in resistance against downy mildew after beta-aminobutyric induction.

The FOS-enhanced grapevine protection was probably due to the combination of over expression of defence related-genes coding mainly for PR proteins and enzymes involved in phytoalexin biosynthesis. These results obtained in *Vitis vinifera* are in agreement with those obtained on tobacco by Nemethoty and Guest¹³ which found that fosetyl-Al, enhanced sesquiterpenoid phytoalexin accumulation, PAL activity, lignin deposition and ethylene biosynthesis after an inoculation.

This work gives an indication of the potential use of transcripts and stilbenes as markers of the defence status of grapevine leaves after FOS elicitation, and after infection, or not. Overall results indicate that modulation of defence gene regulation is often more marked after inoculation with *P. viticola* isolates and this could be in relation to the greater efficacy of grapevine defense on these pathogens.

Although the stimulating of defenses of plants present good reproducible efficiencies in controlled conditions in the laboratory, it turns out that the application of this method *in natura* is more delicate and presents generally very variable efficiencies. Understanding the mechanisms and possessing markers of grapevine resistance status will be a prerequisite for inducer development in integrated pest management in the vineyard.

The results of the Cooke and Little³⁹ experiments indicate that a spraying program where phosphites are integrated with reduced applications of a systemic or non-systemic fungicide could help to suppress foliar and tuber late blight infection and overwinter survival of *P. infestans* in potato tubers.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Bordeaux Wine Trade Council (CIVB) and INRA.

We are grateful to G. Taris and S. Gambier for their technical assistance.

REFERENCES

1. Sequeira, L. Mechanisms of induced resistance in plants. *Annual Review of Microbiology* (1983), 37: 51-79
2. Corio-Costet M.F, *Erysiphe necator*. Monography, Tec/Doc Lavoisier, Paris, 132 pp (2007).
3. Walters D, Newton A and Lyon G, *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*. Blackwell Publishing, Oxford UK, 258 pp (2007).
4. Gril, J. J.; Lucas, P.; Chartier, A.; Sabbagh, C.; Savini, I. Pesticides, agriculture and the environment : Reducing the use of pesticides and limiting their environmental impact. *Collective Scientific Expert Report* (2005): 60 pages
5. Loon LCv, Rep M and Pieterse CMJ, Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162 (2006).
6. Zhao J, Davis LC and Verpoorte R, Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283-333 (2005).
7. Jayaraman J, Ajith A and Subbaratnam M, Pathogenesis-related proteins and their roles in resistance to fungal pathogens in *Fungal disease resistance in plants: biochemistry, molecular biology, and genetic engineering*, Zamir K. Punja, PhD Editor, New-York, London, Oxford, 139-177 (2004).
8. Smillie R, Grant BR and Guest D, The Mode of Action of Phosphite - Evidence for Both Direct and Indirect Modes of Action on 3 *Phytophthora* Spp in Plants. *Phytopathology* 79: 921-926 (1989).
9. Guest D and Grant B, The Complex Action of Phosphonates as Antifungal Agents. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 66: 159-187 (1991).
10. Jackson TJ, Burgess T, Colquhoun I and Hardy GES, Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 49: 147-154 (2000).
11. Hardy GES, Barrett S and Shearer BL, The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology* 30: 133-139 (2001).
12. Daniel R, Wilson BA and Cahill DM, Potassium phosphonate alters the defence response of *Xanthorrhoea australis* following infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* 34: 541-548 (2005).
13. Nemestothy GS and Guest DI, Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37: 207-219 (1990).
14. Fenn ME and Coffey MD, Quantification of Phosphonate and Ethyl Phosphonate in Tobacco and Tomato Tissues and Significance for the Mode of Action of 2 Phosphonate Fungicides. *Phytopathology* 79: 76-82 (1989).
15. Fenn ME and Coffey MD, Further evidence of the direct mode of action of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology* 75: 601-611 (1985).
16. Guest DI, Modification of defence responses in tobacco and capsicum following treatment with fosetyl-Al aluminium tris (o-ethyl phosphonate). *Physiological Plant Pathology* 25 (1984).
17. Guest DI, Upton JCR and Rowan KS, Fosetyl-Al Alters the Respiratory Response in *Phytophthora-Nicotianae* Var *Nicotianae*-Infected Tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34: 257-265 (1989).
18. Bompeix G, Fettouche F and Saindrenan P, Mode of action of phosethyl Al. *Phytiatrie-Phytopharmacie* 30: 257-272 (1981).

19. Guest DI, Evidence from Light-Microscopy of Living Tissues That Fosetyl-Al Modifies the Defense Response in Tobacco Seedlings Following Inoculation by *Phytophthora-Nicotianae* Var *Nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **29**: 251-261 (1986).
20. Saindrenan P, Barchietto T, Avelino J and Bompeix G, Effects of Phosphite on Phytoalexin Accumulation in Leaves of Cowpea Infected with *Phytophthora-Cryptogea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **32**: 425-435 (1988).
21. Saindrenan P, Barchietto T and Bompeix G, Effects of Phosphonate on the Elicitor Activity of Culture Filtrates of *Phytophthora-Cryptogea* in *Vigna-Unguiculata*. *Plant Science* **67**: 245-251 (1990).
22. Delye C and Corio-Costet MF, Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*: RAPD analysis discriminates two biotypes. *Mycological Research* **102**: 283-288 (1998).
23. Corio-Costet M-F, Dufour M-C, Cigna J, Abadie P, Chen W-J (2011) Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* **129**: 315-329
24. Debieu D, Coriocostet MF, Steva H, Malosse C, Leroux P (1995) Sterol Composition of the Vine Powdery Mildew Fungus, *Uncinula Necator* - Comparison of Triadimenol-Sensitive and Resistant Strains. *Phytochemistry* **39**: 293-300
25. Polesani M, Desario F, Ferrarini A, Zamboni A, Pezzotti M, Kortekamp A, Polverari A (2008) CDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *Bmc Genomics* **9**: 142, 17 pages
26. Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F and Lund ST, An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development - art. no. 27. *Bmc Plant Biology* **6**: 27-27 (2006).
27. Giannakis C, Bucheli CS, Skene KGM, Robinso SP, Scott NS, Chitinase and β -1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection. *Australian Journal of Grape Wine Research* **4**: 14-22 (1998).
28. Becot S, Pajot E, Corre DI, Monot C and Silue D, Phytogard(R) (K₂HPO₃) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. *Crop Protection* **19**: 417-425 (2000).
29. Ryals J, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, Steiner HY, Johnson J, Delaney TP, Jesse T, Vos P, Uknes S (1997) The *Arabidopsis NIM1* protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I κ B. *Plant Cell* **9**: 425-439
30. Andreu AB, Guevara MG, Wolski EA, Daleol GR and Caldiz DO, Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. *Pest Management Science* **62**: 162-170 (2006).
31. Wielgoss A and Kortekamp A, Comparison of PR1 expression in grapevine cultures after inoculation with a host- and a non-host pathogen. *Vitis* **45** (2006).
32. Legay G, Marouf E, Berger D, Neuhaus JM, Mauch-Mani B, Slaughter A, Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with *Plasmopara viticola* through suppression subtractive hybridization (SSH). *European Journal of Plant Pathology* **129**: 281-301 (2011).
33. Durrant WE and Dong X, Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185-209 (2004).
34. Schnee S, Viret O and Gindro K, Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **72**: 128-133 (2008).
35. Langcake P, Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon -viniferin, alpha -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* **18** (1981).

36. Pezet R, Gindro K, Viret O and Spring JL, Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**: 297-303 (2004).
37. Romero-Perez AI, Lamuela-Raventos RM, Andres-Lacueva C and de la Torre-Boronat MC, Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 210-215 (2001).
38. Slaughter AR, Hamiduzzaman MM, Gindro K, Neuhaus JM, Mauch-Mani B, Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology* **122**: 185-195 (2008).
39. Cooke LR and Little G, The effect of foliar application of phosphonate formulations on the susceptibility of potato tubers to late blight. *Pest Management Science* **58**: 17-25 (2002).

Table 1: Characteristics of *P. viticola* and *E. necator* isolates.

¹: famoxadone; ²: iprovalivarb; ³: mefenoxam. S=sensitive isolate, R=Resistant isolate.

Pathogen	Isolates	Locality of vineyard	Sampling year	Fungicide sensitivity		
				FAM ¹	I PRO ²	MEF ³
<i>P. viticola</i>						
<i>Pv</i> -R	MIC 128	Bordeaux	2005	R	R	S
<i>Pv</i> -S	COU 15	Bordeaux	2004	S	S	S
<i>E. necator</i>						
				Genetic group		
<i>En</i> -A	LLU 41	Pyrénées-orientales	2006	A		
<i>En</i> -B	PV 74	Pays de l'Aude	2006	B		

Table 2: Primer sets used for gene expression of grapevine.

Genes	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	GenBank N°
Elongation Factor 1- γ Chain (<i>EF1γ</i>)	GAAGGTTGACCTCTCGGATG	AGAGCCTCTCCCTCAAAAGG	AF176496
Phenylalanine ammonia lyase (<i>PAL</i>)	ACAACAATGGACTGCCATCA	CACTTTCGACATGGTTGGTG	X75967
Stilbene synthase (<i>STS</i>)	ATCGAAGATCACCCACCTTG	CTTAGCGGTTCGAAGGACAG	X76892
Leucoanthocyanidin dioxygenase (<i>LDOX</i>)	TGGTGGGATGGAAGAGCTAC	CCCACITGCCCTCATAGAAA	X75966
Anthocyanidin reductase (<i>ANR</i>)	CCTGCCITCAAGACTAGC	GGCCATCAGAGTAGGGATGA	VVI000166
Chalcone isomerase (<i>CHI</i>)	AGAAGCCAAAGCCATTGAGA	CCAAGGGGAGAATGAGTGAA	X75963
Chalcone synthase (<i>CHS</i>)	CCAACAATGGTGTGAGTTGC	CTCGGTCATGTGCTCACGT	X75969
PR protein class 1 (<i>PR1</i>)	CCCAGAACTCTCCACAGGAC	GCAGCTACAGTGTCTTCCA	AJ536326
PR protein class 10 (<i>PR10</i>)	GCICAAAGTGGTGGCTTCTC	CTCTACATCGCCCTTGGTGT	AJ291705
β 1,3 glucanase (<i>PR2</i>)	GGGAGATGTGAGGGGTAT	TGCAGTGAACAAAGCGTAGG	AF239617
Chitinase class IV (<i>PR3</i>)	TATCCATGTGICTCCGGTCA	TGAATCCAATGCTGTTCCA	VVU97521
Serine protease inhibitor (<i>PR6</i>)	ACGAAAACGGCATCGTAATC	TCTTACTGGGGCACCATTTC	AY156047
Chitinase class III (<i>PR8</i>)	AATGATGCCCAAAACGTAGC	ATAAGGCTCGAGCAAGGTCA	Z68123
Polygalacturonase inhibitor protein (<i>PGIP</i>)	CCGGGAAAATCCCATATICT	AAGGTCCAACGACGTCAAAC	AF305093
Lipoxygenase 9 (<i>LOX</i>)	GACAAGAAGGACGAGCCTTG	CATAAGGGTACTGCCCGAAA	AY159556
Glutathione S- transferase (<i>GST</i>)	GGGATCTCAAAGGCAAAACA	AAAAGGGCTTGGGAGTAAT	AY156048
1-aminocyclopropane, 1-carboxylic acid oxidase (<i>ACC</i>)	GAAGGCCITTTACGGGTCTC	CCAGCATCAGTGTGCTCT	AY211459
Anthranilate synthase (<i>ANTS</i>)	AAAAATCCAAGAGGGGTGCT	AAGCTTCTCCGATGCACTGT	XM002281597
Chorismate mutase (<i>CHORM</i>)	TCATTGAGAGGGCCAAATTC	AGGAGGCAGAAAAAGCATCA	FJ604854
Chorismate Synthase (<i>CHORS</i>)	GCCTTCACATGCAGATGCTA	CTGCAACTCTCCCAATGGTT	FJ604855

Table 3: Relative expression of defence-related genes that are significantly induced (***bold and italic***) or repressed (***italic and underlined***) in leaves after pathogen inoculation in comparison with controls un-inoculated at the threshold of 0.05 %.

	Downy Mildew						Powdery Mildew						
	Fungicide Sensitive			Fungicide Resistant			Group A			Group B			
	24 hpi	48 hpi	72 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi	
PR1	-	3.4	<u>-1.6</u>	<u>-2.4</u>	-	-	<u>-14.3</u>	-	-	-	<u>-25.0</u>	-	<u>-3.8</u>
PR2	-	1.5	-	-	<u>-2.9</u>	<u>-7.8</u>	<u>-23.8</u>	<u>-5.4</u>	-	-	<u>-29.9</u>	-	<u>-2.6</u>
PR3	3.8	-	-	3.3	<u>-4.0</u>	-	<u>-22.2</u>	-	-	-	<u>-13.0</u>	3.8	<u>-8.0</u>
PR6	2.1	-	-	<u>-2.4</u>	-	<u>-2.5</u>	-	-	-	-	-	-	-
PR8	-	-	<u>-2.0</u>	-	1.5	<u>-5.4</u>	<u>-6.0</u>	-	<u>-2.9</u>	-	<u>-16.6</u>	-	-
PR10	4.6	-	<u>-1.4</u>	2.3	-	<u>-2.0</u>	-	2.9	-	-	-	-	-
PGIP	<u>-5.1</u>	-	<u>-1.4</u>	2.0	<u>-3.7</u>	-	<u>-21.5</u>	-	-	-	<u>-14.9</u>	-	-
PAL	-	-	-	-	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-
STS	-	-	<u>-2.8</u>	-	-	<u>-2.6</u>	-	6.8	-	-	-	-	39.0
CHI	<u>-100.0</u>	-	<u>-9.1</u>	-	-	<u>-2.2</u>	-	-	<u>-2.9</u>	-	-	-	<u>-100.0</u>
CHS	<u>-50.0</u>	-	<u>-3.6</u>	-	<u>-4.8</u>	<u>-4.0</u>	-	-	-	-	-	<u>-5.0</u>	<u>-1.5</u>
LDOX	<u>-2.7</u>	<u>-1.8</u>	<u>-18.2</u>	<u>-100.0</u>	-	2.0	<u>-7.3</u>	<u>-2.2</u>	2.4	<u>-6.1</u>	<u>-1.5</u>	3.9	3.6
ANR	2.1	1.7	-	-	2.3	1.3	1.5	<u>-4.2</u>	-	1.5	<u>-1.6</u>	-	-
LOX	1.7	-	<u>-12.1</u>	-	15.5	<u>-7.5</u>	<u>-23.0</u>	-	<u>-3.0</u>	<u>-10.2</u>	12.4	12.4	1.5
GST	<u>-3.9</u>	-	<u>-7.4</u>	<u>-3.9</u>	-	<u>-2.5</u>	<u>-5.1</u>	-	<u>-1.3</u>	<u>-10.6</u>	6.4	6.4	-
ACC	<u>-100.0</u>	-	<u>-5.2</u>	-	<u>-3.2</u>	<u>-2.0</u>	<u>-13.2</u>	-	<u>-5.5</u>	<u>-9.2</u>	-	-	-
ANTS	-	3.2	<u>-2.1</u>	-	1.6	-	-	-	-	-	1.7	-	-
CHORM	9.1	-	<u>-1.5</u>	-	-	-	-	<u>-2.8</u>	-	-	<u>-2.7</u>	-	-
CHORS	-	-	-	-	4.6	-	-	-	-	-	-	-	-
% of differentiated genes	63.1	26.3	68.4	36.8	57.9	63.1	52.6	31.6	31.6	52.6	42.1	42.1	42.1
% of up regulated genes	38.5	50	0	42.8	45.5	16.7	10	33.3	16.7	10	62.5	62.5	37.5

Table 4: Relative expression of defence-related genes that are significantly induced (***bold and italic***) or repressed (*italic and underlined*) in FOS-treated leaves in comparison with controls un-inoculated at the threshold of 0.05%.

	24 hpt	48 hpt	72 hpt	96 hpt
<i>PR1</i>	6.91	16.35	3.60	-1.66
<i>PR2</i>	-1.14	<u>-8.88</u>	-1.02	<u>-6.18</u>
<i>PR3</i>	2.66	-1.84	1.23	1.05
<i>PR6</i>	1.59	2.61	1.72	2.04
<i>PR8</i>	3.56	<u>-7.71</u>	-2.62	1.52
<i>PR10</i>	4.16	11.43	2.67	1.07
<i>PGIP</i>	3.00	9.90	-1.66	-1.11
<i>PAL</i>	1.07	2.75	2.08	1.11
<i>STS</i>	2.12	3.93	1.17	1.06
<i>CHI</i>	2.00	<u>-5.00</u>	-1.19	<u>-6.44</u>
<i>CHS</i>	2.16	-1.02	2.05	1.38
<i>LDOX</i>	2.08	2.18	1.39	2.75
<i>ANR</i>	-1.30	1.41	1.21	-1.51
<i>LOX</i>	1.26	7.57	4.88	<u>-7.06</u>
<i>GST</i>	4.07	2.23	1.09	1.42
<i>ACC</i>	-1.49	<u>-7.17</u>	-1.28	<u>-9.28</u>
<i>ANTS</i>	3.78	3.58	4.52	-1.10
<i>CHORM</i>	3.24	10.64	<u>-6.50</u>	1.59
<i>CHORS</i>	5.59	4.08	-2.04	-1.14
% of differentiated genes	42.1	68.4	15.8	21.1
Relative % of up regulated genes	100.0	69.2	66.7	0.0

Table 5: Relative expression of defence-related genes that are significantly induced (***bold and italic***) or repressed (*underlined and italic*) in FOS pre-treated leaves after inoculation in comparison with controls inoculated at the threshold of 0.05.

	<i>Plasmopara viticola</i>			<i>Erysiphe necator</i>		
	24 hpi	48 hpi	72 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi
<i>PR1</i>	-1.34	<u>-8.13</u>	30.62	1.40	3.47	1.50
<i>PR2</i>	6.85	3.55	4.99	2.21	3.24	5.50
<i>PR3</i>	4.05	1.99	4.02	4.63	-1.86	3.47
<i>PR6</i>	-2.33	-1.24	7.80	<u>-1.18</u>	1.39	3.24
<i>PR8</i>	2.72	1.49	6.77	12.93	-1.30	-1.50
<i>PR10</i>	1.88	3.52	4.28	3.38	-1.01	-1.15
<i>PGIP</i>	14.47	3.47	4.45	5.60	-1.75	2.73
<i>PAL</i>	1.06	-2.48	<u>-1.20</u>	2.10	1.51	1.80
<i>STS</i>	2.39	1.39	4.61	-1.63	1.44	-2.82
<i>CHI</i>	<u>-4.78</u>	9.84	5.57	<u>-26.19</u>	1.51	8.46
<i>CHS</i>	1.92	2.89	50.64	-2.17	2.99	-1.29
<i>LDOX</i>	<u>-1.68</u>	-1.10	<u>-2.46</u>	15.79	-1.47	1.11
<i>ANR</i>	-2.08	-3.59	<u>-1.43</u>	1.14	1.90	-1.28
<i>LOX</i>	1.72	<u>-4.52</u>	7.55	1.16	<u>-5.02</u>	-1.55
<i>GST</i>	5.47	-4.83	5.03	2.42	-2.09	1.04
<i>ACC</i>	1.56	1.37	2.91	-1.21	-2.97	1.41
<i>ANTS</i>	1.67	3.68	3.02	-1.28	2.23	19.30
<i>CHORM</i>	<u>-13.48</u>	-1.11	1.57	7.22	2.11	-1.87
<i>CHORS</i>	-1.78	<u>-10.10</u>	1.41	-2.98	1.40	-1.02
% of differentiated genes	42.1	47.4	100.0	47.4	10.5	36.8
Relative % of up regulated genes	71.4	66.7	84.2	77.8	50.0	100.0

Figure legends

Figure 1: Protection of grapevine detached leaves in response to Fosetyl treatment against *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*. Fosetyl (1.13 mM) was sprayed 24 hours before pathogen inoculations. Diseases were assessed 7 and 12 days post-inoculation for downy and powdery mildew respectively and expressed as the percentage of growth inhibition. Results represent the mean \pm standard deviations. Statistical analysis was performed using variance analysis using the statistical software Systat 11 (Systat Software, Inc) and significant differences were determined by Tuckey's honest significant difference (HSD) test at level of $P \leq 0.05$.

Figure 2: Relative gene expression in infected leaves with different isolates of *Plasmopara viticola* (*Pv*) and *Erysiphe necator* (*En*), without (A) or with BTH pre-treatment (B). Each column represents the time point after pathogen inoculation (24, 48 or 72 hpi) and each line corresponds to one gene represented by a single row of boxes. The colour scale bars represent the ratio values corresponding to the mean of two independent experiments. Genes with a higher expression level appear in red with a colour gradient, while those with lower intensity appear in blue (in white no change in gene expression compared to respective control uninoculated and without treatment at each time and at each foliar stage). In Fig. 3B, the columns corresponding to BTH treatment alone represent the mean of the relative gene expression of the different foliar stages of the two independent experiments.

Figure 3: Means of relative expression of defense-related genes during three days in FOS pre-treated leaves after inoculation in comparison with controls no inoculated. Values which are significantly induced at the threshold of 0.05 were bold underlined. Data corresponded at the mean of 2 independent experiments for *E. necator* and *P. viticola*.

Figure 4: Correlation between the percentages of genes up regulated and leaves protection triggered by Fosetyl against downy and powdery mildew

Figure 5: HPLC quantification of polyphenol content in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to FOS treatment, with or without pathogen inoculations. Grapevine leaves were pre-treated 24 hours before downy and powdery mildew inoculations with 1.13mM of FOS. Results represent the means (\pm standard deviations) of four experiments. Stars represent the values significantly different from controls at the threshold of 0.05 %.

Figure 6: HPLC quantification of three *trans*-stilbenes in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to FOS treatment, with or without *P. viticola* inoculations. Grapevine leaves were pre-treated 24 hours before downy and powdery mildew inoculations with 1.13 mM of FOS. (A) *trans*-piceid, (B) *trans*-resveratrol and (C) pterostilbene. Results represent the means (\pm standard deviations) of four experiments. Stars represent the values significantly different from controls at the threshold of 0.05 %.

(□) control; (▨) FOS treatment; (▤) *Pv*-infected leaves; (■) *Pv*-infected leaves and FOS treatment.

Figure 7: HPLC quantification of three *trans*-stilbenes in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to FOS treatment, with or without *E. necator* inoculations. Grapevine leaves were pre-treated 24 hours before downy and powdery mildew inoculations with 1.13 mM of FOS. (A) *trans*-piceid, (B) *trans*-resveratrol and (C) pterostilbene. Results

represent the means (\pm standard deviations) of four experiments. Stars represent the values significantly different from controls at the threshold of 0.05 %.

(□) control; (▨) PK₂ treatment; (▤) *En*-infected leaves; (■) *En*-infected leaves and PK₂ treatment.

Fig. 1. Protection of grapevine detached leaves in response to fosetyl treatment against *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*. Mean of the growth inhibition of two isolates for each pathogen in two independant experiment.

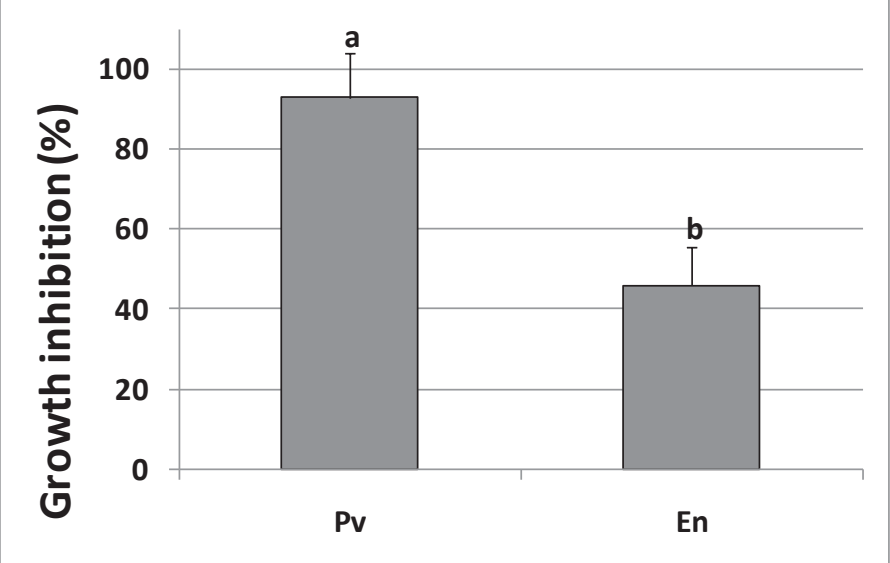
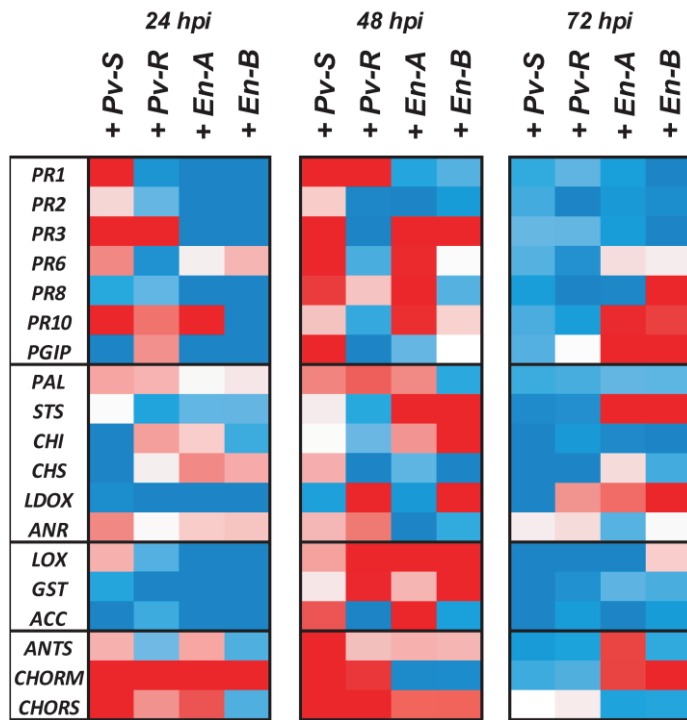


Fig. 2.

A



B

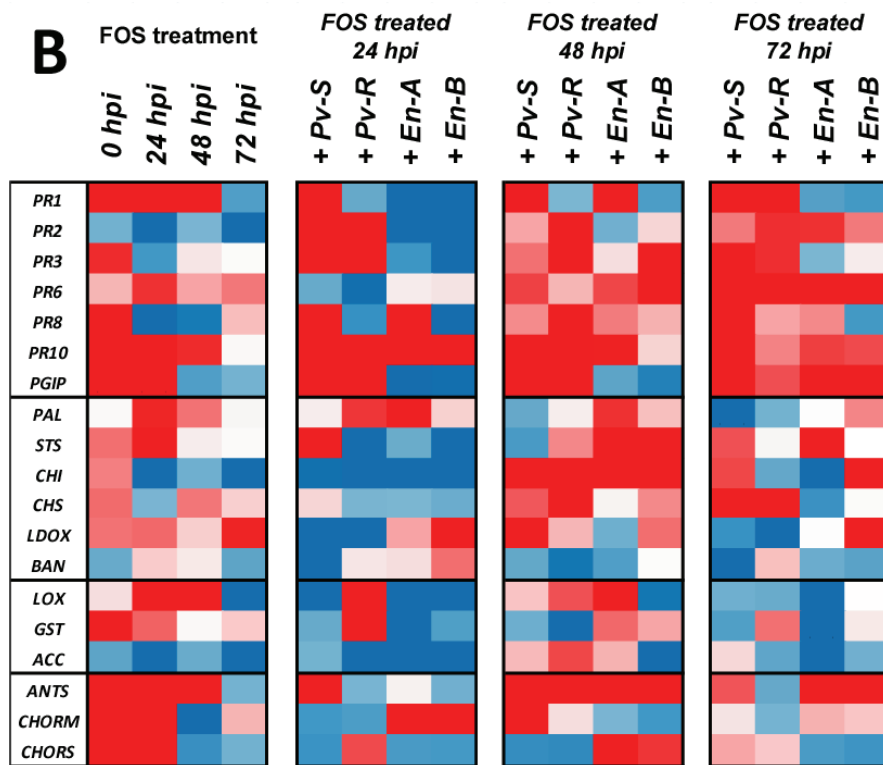


Fig3. Means of relative expression of defence-related genes during three days in FOS pre-treated leaves after inoculation in comparison with controls untreated and no inoculated.

+ Pv + En

<i>PR1</i>	10.50	2.12
<i>PR2</i>	5.13	3.65
<i>PR3</i>	3.35	2.88
<i>PR6</i>	3.01	1.82
<i>PR8</i>	3.66	4.79
<i>PR10</i>	3.23	1.75
<i>PGIP</i>	7.46	2.97
<i>PAL</i>	-1.31	1.80
<i>STS</i>	2.80	-1.24
<i>CHI</i>	5.21	3.34
<i>CHS</i>	18.5	1.41
<i>LDOX</i>	-1.57	5.86
<i>BAN</i>	-2.06	1.28
<i>LOX</i>	3.16	-1.50
<i>GST</i>	3.57	1.31
<i>ACC</i>	1.95	-1.17
<i>ANTS</i>	2.79	7.44
<i>CHORM</i>	-1.18	3.29
<i>CHORS</i>	-1.45	-1.10

Fig. 3. Correlation between the percentages of genes up regulated and leaf protection triggered by Fosetyl against downy and powdery mildew.

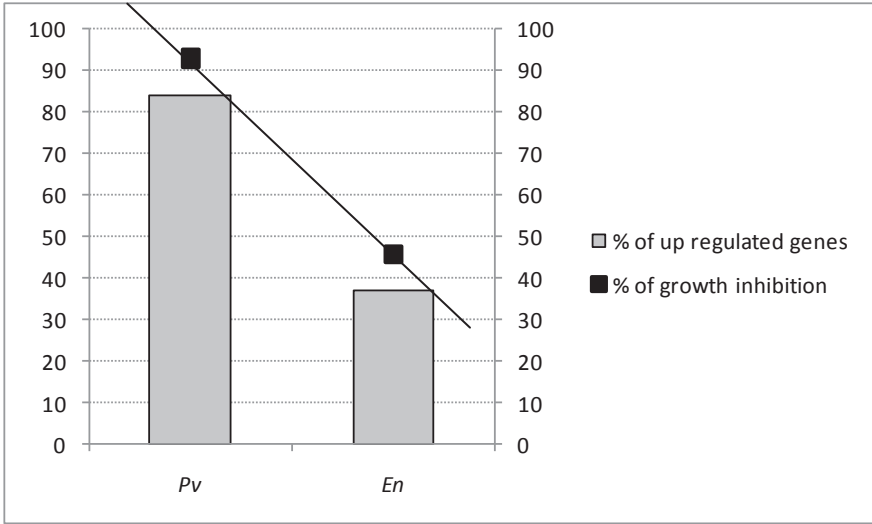


Fig. 4. Quantification of polyphenol content in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to FOS treatment, with or without pathogen inoculations.

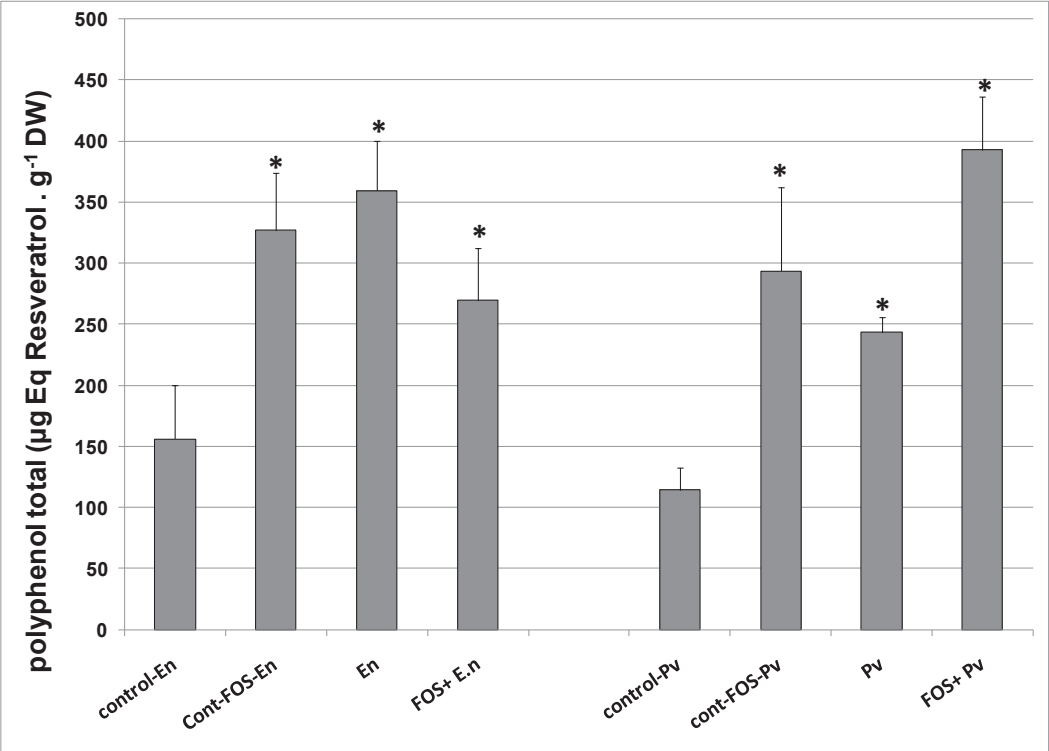


Fig.5. HPLC quantification of three *trans*-stilbenes in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to FOS treatment, with or without *P. viticola* inoculations.

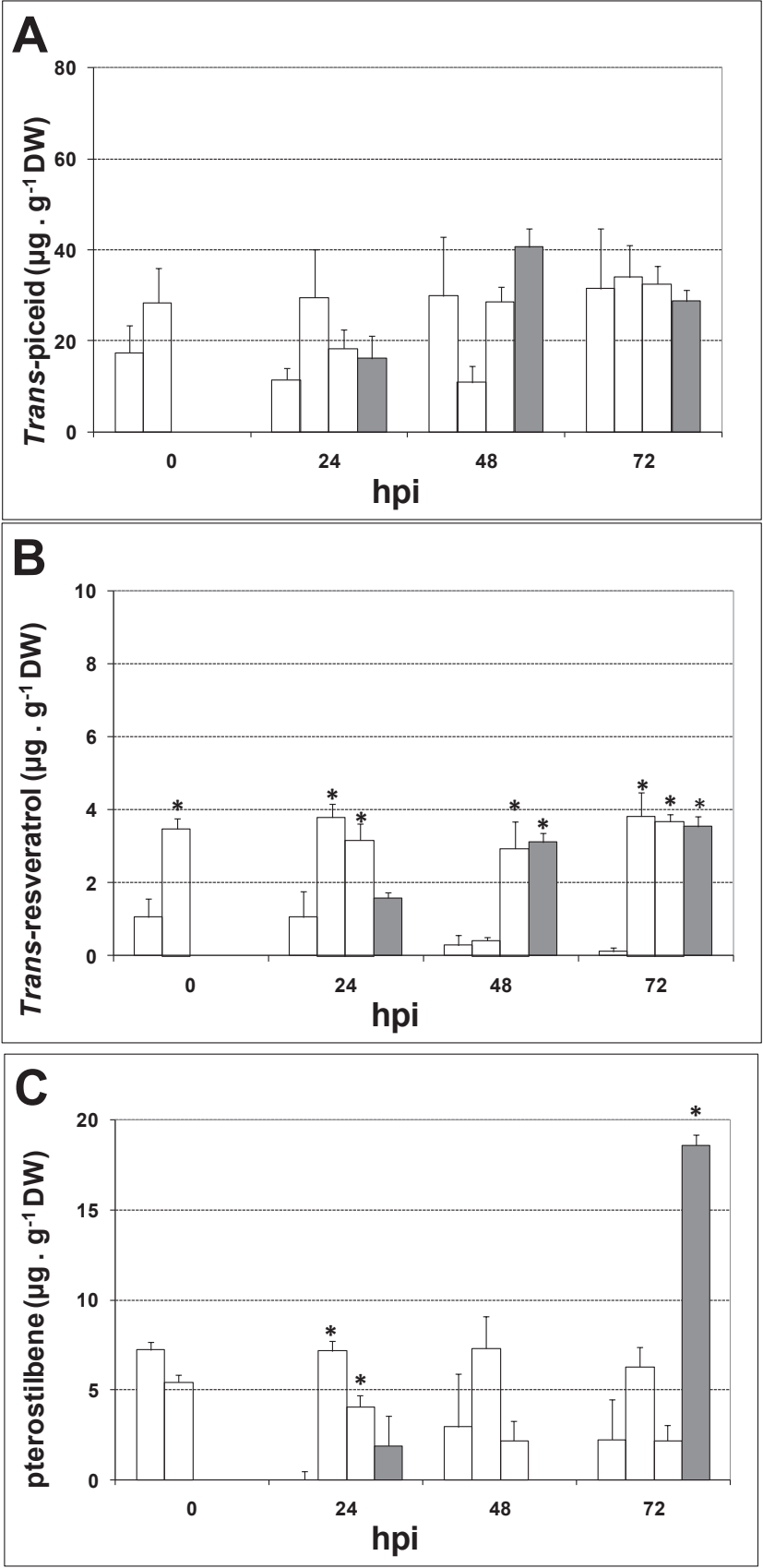
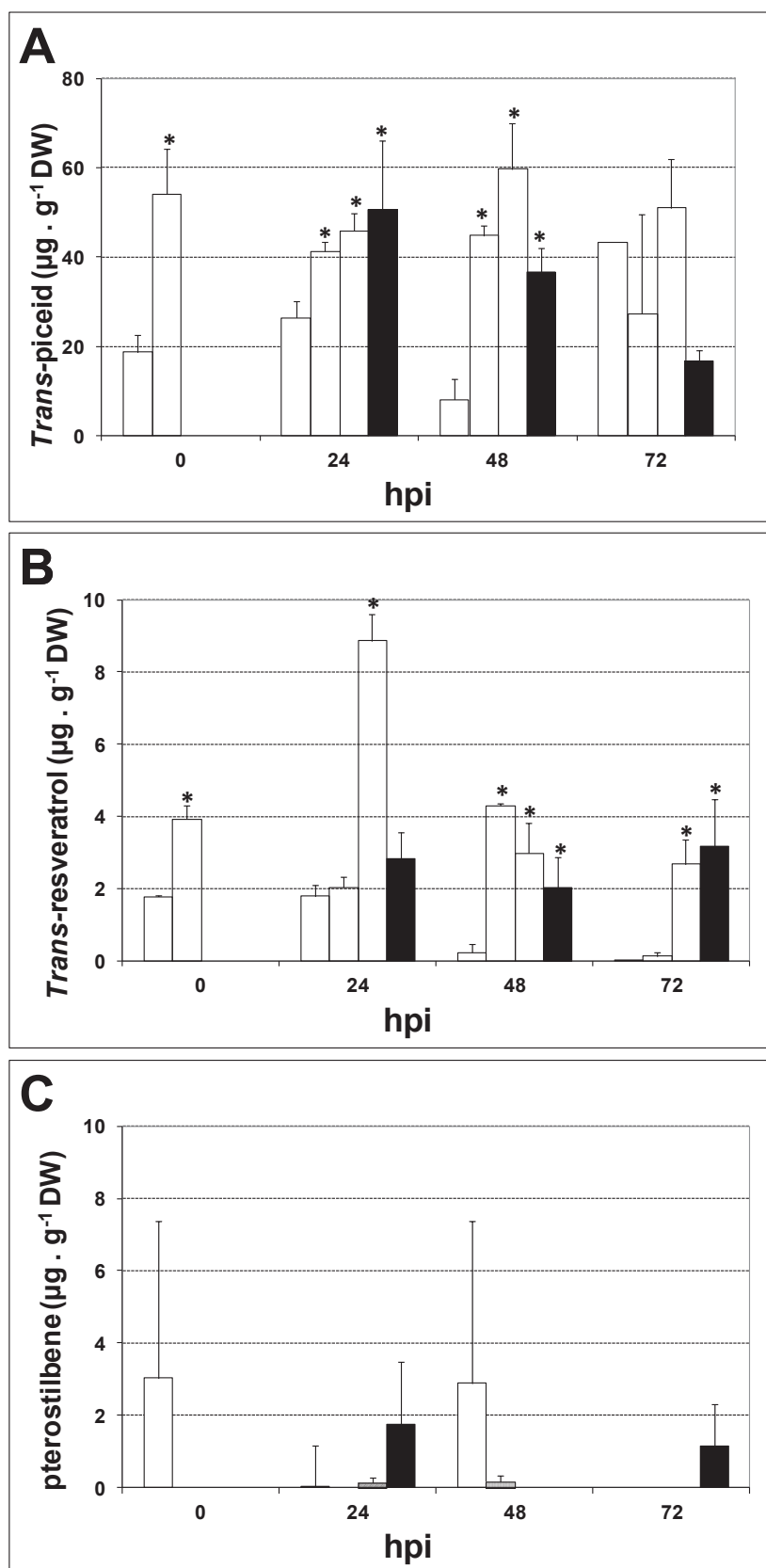


Fig 6. HPLC quantification of three *trans*-stilbenes in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to FOS treatment, with or without *E. necator* inoculations.



2.4. A fertilizer with potassium-phosphonate elicits disease resistance against powdery and downy mildew in grapevine (en preparation pour soumission dans Journal of agricultural and food chemistry)

Marie-Cécile Dufour¹, Stéphanie Cluzet², Jean-Michel Mérillon² and Marie-France Corio-Costet^{1*}

¹ Institut National de la Recherche Agronomique, UMR Santé Végétale, CR Bordeaux, BP 81, 71 avenue E. Bourleaux, 33883 Villenave d'Ornon CEDEX, France.

² Institut des Sciences de la Vigne et du Vin- Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activités Biologiques, 210 chemin de Leysotte, CS 50008, 33882 Villenave d'Ornon.

Running title: Phosphonate elicitation and grapevine responses to mildews

Key words: potassium phosphonate, chemical induced resistance, *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola*, gene expression, stilbene accumulations.

A

Alternative key words: PK₂, plant defense genes, polyphenols, grapevine, downy mildew, powdery mildew, Potassium phosphonate,

ABSTRACT

Phosphites are used as fungicide or fertilizer and have a complex mode of action against fungi involving direct and indirect effects with a rapid and strong stimulation of plant defense mechanisms. The efficacy and the role of a phosphonate fertilizer (PK₂) was investigated in the enhanced resistance of grapevine pre-treated leaves in response to infection with different isolates of downy and powdery mildew (*Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*).

The grapevine leaf protection triggered by PK₂, limiting the development of *E. necator* and *P. viticola* from 27.9 % to 81.5% respectively. The pretreatment with the PK₂ led light modifications at the transcriptional level in absence of the challenge of the pathogens (7 genes on 19 are differentially expressed) while it led strong gene modulation of 17 genes 19 in downy and powdery mildew defense response during the three days. The pre-treated grapevine defense responses against a downy mildew attack led in a stronger over-expression of genes coding for the PR proteins (*PR1*, *PR3*, *PR6*, *PR10* and *PGIP*) than those led in powdery mildew attack (*PR6*, *PR8* and *PR10*). The PK₂-enhanced grapevine protection was probably due to the combination of over expression of defence related-genes coding mainly for PR proteins and pterostilbene accumulations.

INTRODUCTION

The grapevine (*Vitis vinifera*) is subjected to the pressure of numerous bio aggressors (fungi, bacteria and virus) among which the powdery and the downy mildew, that attack all plant organs and result in poor fruit set and poor fruit quality, resulting in significant economic losses.

Plasmopara viticola (Berk & Curt.), a biotrophic oomycete which caused downy mildew, is one of the most destructive grapevine diseases. This disease is present in many parts of the world. Primary infection begins with over-wintering oospores which germinate into motile zoospores that can actively locate stomata and start the infection process. Colonization involves intercellular mycelia growth and the differentiation of haustoria, which penetrate parenchyma cells but not breaking the plasma membrane (1).

Powdery mildew caused by biotrophic fungus *Erysiphe necator* on grapevine is a haploid heterothallic ascomycete. After over winters as resting mycelium within dormant buds, it produced wind-dispersed conidia by asexual reproduction on green leaves of the growing host and colonized young flag shoots. It may also produce cleistothecia by sexual reproduction at the end of the annual cycle on bark of grapevine from which ascospores were released during the spring initiating primary infections on susceptible tissues (2).

The control of diseases caused by these pathogens, an intensive use of fungicides is required. The vineyard consumes 16 % of fungicides marketed in France every year. To reduce the environmental impact of their intensive use (pesticide-resistant pathogen strains appearance and residues found in wines) while maintaining a high level of agricultural production, in quantity and in quality, efforts must be made to develop alternative protection strategies.

An interesting alternative and/or complementary method consists of the use of elicitors to induce natural plant defenses. Although susceptible plants possess the machinery necessary for resistance, it is not activated in sufficient magnitude or speed to restrict the infection.

The recognition of the microorganism by the plant and the induction of the defense mechanisms are introduced by the perception of molecules called elicitors. The most frequent premature cellular answers are mechanisms of modifications of ion fluxes, of production of active forms of the oxygen (oxidative burst) and of protein phosphorylation (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK or MAPKK and MAPKKK) and the synthesis of signal molecules such as salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene (3, 4). The cellular and molecular metabolic modifications set up systematically three categories of reactions: the reinforcement of plant cell walls, accumulation of antimicrobial compounds such as phytoalexins and the synthesis of pathogenesis related-proteins (PR proteins).

Phosphites act as fungicide or fertilizer and have a complex mode of action against fungi, involving both direct and indirect effects, with stimulation of plant defense mechanisms (5-18). Phytoalexins from *Vitaceae* are phenolic compounds product by the phenylpropanoid pathway which play an important role in the secondary plant metabolism including lignins, phenolic acids, flavonoids and stilbenes. Stilbens have biological activity against a wide range of pathogens and can be considered as markers for plant disease resistance (19).

Potassium phosphonate used here (PK₂) is commercialized as a “fertilizer (Proval®, Technidis-Agro) which increases the efficiency of treatments against downy mildew on potatoes and allows dividing by 2 the doses of fungicide” (20).

The present study aimed to evaluate the effect of a foliar application of PK₂ on detached grapevine leaves and to analyze the grapevine protection against the two major bio-aggressors, *P. viticola* and *E. necator*. Since phytoalexin accumulation is a part of the general

defense response induced by phosphonates, quantitative HPLC analyses of stilbenes, major antimicrobial compounds of grapevine, were performed as well as investigation of the expression level of genes encoding for enzymes involved in the phenylpropanoid pathway (*PAL*, *STS*, *CHI*, *CHS*, *LDOX* and *ANR*), coding for PR-proteins (*PR1*, *PR10*, *PR2*, *PR3*, *PR6*, *PR8* and *PGIP*), involved in the oxido reduction system (*GST*), in the ethylene or oxylipine pathways (*ACC* and *LOX* respectively) and others involved in the indole pathway (*ANTS*, *CHORM* and *CHORS*) were monitored by real-time quantitative polymerase chain reaction (RTq-PCR). Here we showed that the pre-treatment of a susceptible cultivar (Cabernet Sauvignon) of grapevine with PK₂ prior to infection with *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*, the two major biotrophic pathogens of the grapevine, primed the accumulation of specific phytoalexins and the over expression of defense related genes. As result, the susceptible cultivar became more resistant to downy and powdery mildew.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Grapevine (*Vitis Vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) was propagated from wood cuttings in a greenhouse. We took the third and the fourth leaves at the top of the plant. The first one was used for powdery mildew experiments and the second one for those of downy mildew.

For powdery mildew experiments, leaves are disinfected in a solution of 5 % of calcium hypochlorite during 10 minutes under a horizontal lamination flow. After rinsing with some sterile distilled water and drying, the sterile leaves were placed in a Petri dish, lower face in touch with an agar plate (5 % of agar containing 0.003 % of benzimidazole) or a Whatmann's paper moistened with 2.5 ml of sterile water.

For downy mildew experiments, the washed and dried leaves were placed in a Petri dish, a superior face in touch with the Whatman's paper soaked with some sterile water.

PK₂ treatment, Inoculation Procedure and Disease Evaluation

PK₂ (Proval®, Technidis-Agro) was used to at the final concentration of 3.18 mM. Solutions of PK₂ were prepared on the day of application. Controls were applied with the same amounts of sterile distilled water. Treatments were applied as a fine mist to 6 whole detached leaves (above 1.5 ml per Petri dish).

Twenty four hours after treatment, leaves were dried by opening of Petri dishes, during approximately 1 hour in sterile conditions for powdery mildew experiments or not for downy mildew experiments.

A collection of downy mildew isolates were produced on vine leaves in survival. Grape leaves previously treated or not were inoculated with spore suspensions of two isolates presenting different sensibility to several fungicides (Table 1) at 5000 sporangia ml⁻¹ (15 drops of 15 µl per leaf) and incubated for 7 days at 22°C with a 16-8 hr photoperiod.

Six leaves were collected 24,48 and 72 hours after pathogen inoculation, 3 of them were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for molecular analyses and the other were frozen and stored at -20°C for biochemical analyses. Six inoculated leaves treated and not treated were incubated in culture chamber at 22 °C under a 16 h photoperiod for seven more days.

Two powdery mildew isolates belonged to the two different genetic groups (A and B) (Table 1) were inoculated under sterile conditions on decontaminated grape leaves (cv. Cabernet

Sauvignon) in Petri dishes as previously described (21), in sterile conditions. Leaves were placed at the bottom of a Plexiglass settling tower and conidia were blown in at the top from sporulating leaves (1000-1500 conidia per cm² of leaf). Inoculated leaves were incubated for 12-14 days at 22°C with a 16 h photoperiod.

Two independent experiments were performed for each pathogen with 2 different isolates.

The number and size of mildew colonies formed on the leaf segments were assessed to determine a mean growth inhibition. Disease severity was determined by estimating the level of growth and intensity of fungal mycelium growth and sporulation by a visual scale (0 to 100 %).

The results of treatment efficiency were presented in the form of average percentage of inhibition of the growth of the fungus with regard to the modality control, pulverized with some sterile water, obtained by the following calculation:

$$\% \text{ growth inhibition} = 100 \times [(\% \text{ growth "treated"} / \% \text{ growth "control"}) - 1]$$

All data were subjected to variance analysis using the statistical programme Systat 11 (Systat Software, Inc) and significant differences were determined by Tuckey's honest significant difference (HSD) test at level of $P \leq 0.05$.

RNA Extraction and Quantification of Gene Expression by Real-Time Quantitative RT-PCR

For molecular analysis, we quantified the expression levels of 20 genes selected for their involvement in defence by real time quantitative polymerase chain reaction (RTq-PCR) using an Elongation Factor gene as internal standard in removed whole leaves sprayed or not with PK₂ solution (3.18 mM) and inoculated or not with powdery and downy mildew. 24 hours after PK₂ stimulation. Leaves are taken daily during 3 days and freezed at -80°C. The experiment was twice realized independently for each pathogen category.

The leaves were ground in the presence of liquid nitrogen, and the resulting powder was used for RNA extraction. RNA was isolated from frozen tissue samples by chloroform extraction followed by lithium chloride precipitation according to the method of Reid *et al* (22). The extraction buffer contained 300 mM Tris HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB, 2% PVPP, 0.05% spermidine trihydrochloride and just prior to use 2% β-mercaptoethanol. Tissue was ground to a fine powder in liquid nitrogen using a mortar and pestle. The powder was added to pre-warmed (65°C) extraction buffer at 20 ml/g of tissue and shaken vigorously. Since berries have higher water content than other grape tissues, a lower extraction buffer ratio of 10–15 ml/g weight was sufficient. Tubes were subsequently incubated in a 65°C water bath for 10 min and shaken every couple of min. Mixtures were extracted twice with equal volumes chloroform:isoamyl alcohol (24:1) then centrifuged at 3.500 × g for 15 min at 4°C. To the supernatant, 0.1 vol 3 M NaOAc (pH 5.2) and 0.6 vol isopropanol were added, mixed and then stored at -80°C for 30 min. Nucleic acid pellets (including any remaining carbohydrates) were collected by centrifugation at 3.500 × g for 30 min at 4°C. The pellet was dissolved in 1 ml TE (pH 7.5) and transferred to a microcentrifuge tube. To selectively precipitate the RNA, 0.3 vol of 8 M LiCl was added and the sample was stored overnight at 4°C. RNA was pelleted by centrifugation at 20.000 × g for 30 min at 4°C then washed with ice cold 70% EtOH, air dried, and dissolved in 50–150 µl DEPC-treated water. RNAs were quantified after DNase I digestion by absorbance measure at 260nm and 280 nm and 260/280 nm ratios were determined (Genequant pro. Amersham Bioscience. France). cDNAs were synthesized from 2 µg of the RNA were reverse-transcribed using 2 µM oligo d(T)₁₅, using

Promega reagents. The reverse transcription reaction mix is assembled on ice to contain nuclease-free water. M-MLV reverse transcriptase and its 5X reaction buffer. dNTPs, and ribonuclease inhibitor according to the manufacturer's instructions. An initial annealing at 4°C for 5 min. the reaction is incubated at 42°C for 1hr. The obtained cDNA was stocked at -20°C.

Real-time PCR reactions were performed in 96-well plates with a CFX 96 system thermocycler (Bio-Rad france. Ivry sur Seine) using SYBR[®] Green to detect dsDNA synthesis. For each reaction, 1µl of each primer at 10nM and 7 µl of 2X- Blue SYBR Green fluorescein Mix including Hot start DNA polymerase. dNTP and MgCl₂ (Abgene, France) and 5µl of cDNAs, were used in compliance with manufacturer's instruction. Amplifications were performed in a real-time thermal CFX 96 system under the following conditions: a first step at 94°C for 15 min. and 40 cycles at 94°C for 10 s. 55°C for 10 s. and 72°C for 20 s. Relative gene expression was obtained with the formula: fold induction = $2^{-[\Delta\Delta Cq]}$, where $\Delta\Delta Cq = [Cq\ GI\ (unknown\ sample) - Cq\ EF1\gamma\ (unknown\ sample)] - [Cq\ GI\ (reference\ sample) - Cq\ EF1\gamma\ (reference\ sample)]$ with control leaves (no untreated and no inoculated) at each time point (0, 24, 48 and 72hours after treatment) as reference sample. GI is the gene of interest, and EF1 γ is the grapevine Elongation Factor1 γ gene used as the internal control. The reference sample is the sample chosen to represent 1 \times expression of the gene of interest (e.g., control leaves untreated and no inoculated). Each sample was assayed in duplicate at the minimum.

To ensure correct normalization in real-time PCR, amplification efficiencies should be similar. Each PCR system was tested with cDNA samples which were serially diluted in 1:10 ratios with distilled water. Amplification efficiencies should be determined from the slope of the log-linear portion of the calibration curve. Specifically, PCR efficiency = $10^{-1/slope} - 1$, when the logarithm of the initial template concentration of known cDNA amounts (the independent variable) is plotted on the x axis and Cq (the dependent variable) measured by the CFX 96 system software (Bio-RAD. Hercules, CA, USA) is plotted on the y axis.

Dissociation curves for each amplicon were then analyzed to verify the specificity of each amplification reaction; the dissociation curve was obtained by heating the amplicon from 60°C to 95°C (Data not shown).

Statistical analyses were carried out using the Systat 11 software (Systat Software, Inc). Expression ratios for each cDNA were calculated for each time point relative to control leaves at this time. Means of relative expression obtained in control and other treatments and/or inoculations were compared with the analysis of variance using Tukey's post hoc test.

Quantification of Stilbenes

For chemical analysis, we analysed the polyphenol content in removed whole leaves sprayed or not with PK₂ solution (3.18 mM) and inoculated or not with powdery and downy mildew, 24 hours after stimulation. Leaves are taken daily during 3 days and frozen at -80°C.

Leaves were freeze-dried during 24 hours. Freeze-dried leaves (\approx 0.1 g) were homogenized with 20 ml of Methanol by means of an Ultra-Turrax (Kinematica, Swiss). After incubation during the overnight in the darkness, the extracts were filtrated on glass wool and rinsed 3 times with 1ml of MeOH 100%. Extracts were concentrated under reduce pressure with a Rotavapor Re 111 (Büchi, Swiss). We added 1 ml of MeOH 30 % to dry extracts. The total extracts were purified using a purification column (Sep-pack Cartridges C18. Waters, France), eluted with 5 ml of MeOH 90%.

Fractions were concentrated in reduced pressure (Speed-vac RC 1010. Jouan, France), readjusted at 1ml with MeOH 50% and filtered with Acrodisc® syringe filters nylon (Sigma, 0.45 µm pore size).

One hundred µl of sample was injected automatically (Kontro HPLC 360 autosampler) in a ProntoSil Eurobond C18 reverse phase column (4.0 ID X 250 mm, 5 µm). The crude extract samples were eluted at a flow rate of 1ml/min, with A solvent (1% trifluoroacetic acid in water) and B solvent (80% acetonitrile + 20 % A solvent). The run was set as follows: 0 to 5 min, from 10% B to 20% B; 5 to 19 min, 20 % B to 25 % B; 19 to 20 min, 25% B to 30 % B; 20 to 35 min, from 30% B to 40% B; 35 to 50 min, 40% B; 50 to 55 min, from 40% B to 60% B; 55 to 56 min, from 60% B to 100% B; 56 to 60 min, 100% B; 60 to 62 min, gradient processing from 100 % solvent B to 10 % solvent B and to 7% solvent B in 10 minutes.

Stilbene dosages (resveratrol, piceid and pterostilbene) were made by HPLC system equipped with a fluorescent detector set (Detector Prostar 363, Varian) at an excitatory wavelength at 300nm and an emission wavelength at 390nm. Stilbene contents were estimated from calibration curves prepared with pure standards. Standard range were realised with resveratrol , piceid and pterostilbene solutions at 0.25, 0.5, 1, 1.5 and 2 µg/100 µl in MeOH 50 %. Each dosage was made 3 times.

The surface of detected peak permit to calculate stilbene content in relation to reference curves with pure compounds.

Data were expressed as the means (\pm standard deviations) of at least four quantifications. Statistical analysis was carried out using Newman-Keuls or Student's *t*-tests at level of $P \leq 0.05$.

RESULTS

Effects of PK2 on Grapevine Protection

We tested PK₂ efficiency against 2 different strains of powdery mildew and downy mildew having different origins and biotypes (Table 1).

The results in Fig.1 show that grapevine leaves treated with 3.18 mM of PK₂ resulted in a inhibition of growth compared with control leaves. The reduction in disease severity was estimated as the percentage of fungi growth inhibition. The percentage of *P. viticola* growth suppression was 81.5 % with 92.56 ± 11.02 % and 70.83 ± 23.92 % for *Pv-S* and *Pv- R* isolates and that of *E. necator* was 27.9 % with 27.50 ± 11.38 % and 28.29 ± 30.03 % for for *En-A* and *En- B* isolates .

Transcript profiles reveal specific responses of the grapevine depending on the species of biotrophic pathogen.

V. vinifera is especially susceptible to mildew. To explore compatible interaction with different obligate pathogens, a comparison in time of transcript profiles of selected genes of leaves infected with two isolates of *P. viticola* (Mic-128: *Pv-R* and Cou-15: *Pv-S*) and two isolates of *E. necator* (Llu-41: *En-A* and Pv74: *En-B*) was carried out (Table 2). The grapevine defenses were measured by transcript kinetics at 24, 48 and 72 hours post-inoculation (hpi) and completed by biological efficacies at 8 or 12 dpi (see above). The gene set used included PR proteins, some genes involved in the phenylpropanoid pathway, others involved in the oxido reduction system, in the ethylene or oxylipine pathways and others involved in the indole pathway (Table 2, Fig. 2).

At 24 hpi, the transcript analysis in grapevine leaves pointed to a down-regulation of genes with 57.2 to 58.4% of the differentially -expressed transcripts significantly down-regulated in *P. viticola*-infected leaves, and 90% in *E. necator*-infected leaves (Fig. 3A, Table 3). In *Pv*-infected leaves, some transcripts were up-regulated in the presence of two *P. viticola* isolates, such as *PR-3* and *PR-10*. However, transcript profiles also varied depending on the isolate and the genes under consideration (e.g. *PR-1*, *PR-6*, *CHI*, *CHS*). Indeed, in leaves infected with *P. viticola* fungicide- sensitive isolate (*Pv-S*), genes involved in the phenylpropanoid pathway (*CHI*, *CHS*) were strongly repressed, whereas in *Pv-R* infected leaves, it was the *LDOX* gene coding for enzyme situated more in down-stream of the pathway which was specifically repressed. In *En*-infected leaves, the PR-protein transcripts (*PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR-8*, *PGIP*) were generally significantly down-regulated.

Only four genes behaved in a similar way whatever the pathogen 1 considered: *LDOX* (polyphenol pathway), *ACC* (ethylene pathway), and *GST* (oxidative stress response system) transcripts which were all repressed, and the *CHORM* (indole pathway) transcript which was up-regulated.

At 48h hpi (Fig. 3A, Table 3), most of the grapevine transcripts were not affected significantly in *Pv-S* and *En-A*-infected leaves (26.3% and 31.6% of differentiated genes, respectively). By contrast, in *En-B* and *Pv-R*-infected leaves, 42.1 to 57.9% of transcripts were either down or up-regulated. In *Pv*-infected leaves, some PR- protein transcripts were up-regulated such as *PR- 1*, *PR-2*, *PR-6*, *PR-8*) depending on the isolate under consideration, while in *En*-infected leaves only *PR-3* was over-expressed. A peculiarity of *En*-infected leaves was the accumulation of *STS* transcripts and the repression of ANR and CHORM transcripts (Table 3). By contrast, an up-regulation of *ANR* and *ANTS* transcripts was specific to *Pv*-infected leaves.

At 72 hpi, the majority of differentiated transcripts (83.4 to 100 %) in *P. viticola*-infected leaves were down-regulated, with significant down-regulation of transcripts of the phenylpropanoid pathway (*STS*, *CHI*, *CHS*), PR-proteins, *LOX*, *GST* and *ACC* (Fig. 3A, Table 3). In *E. necator*-infected leaves, the down-regulation was also high with 62.5 to 83.4% of differentiated transcripts affected, with *CHI* and *PR-1*, *PR-2* commonly repressed. Only the *LDOX* gene was over-expressed in *En*-infected leaves, suggesting the possibility of metabolic flow towards flavonoid biosynthesis.

Effect of Potassium Phosphonate (PK₂) Treatment on Defense Gene Expression in uninoculated Grapevine Leaves

Over time, in PK₂ treated-leaves, 0 to 68.4 % of transcripts were significantly affected, mainly at 48 hpt (68.4 %, Table 3 and Figure 2B). A slight regulation of PR-proteins (*PR10* and *PGIP*) was observed at 24 and 48 hpi. The *GST*, *ANTS* and *CHORM* genes were rather up-regulated over the time. Transcript accumulation of *PGIP*, *GST*, *ANTS*, *CHORM* and *CHORS* genes were rapidly up-regulated 24 hours after PK₂ treatment and a maximal induction of 3-, 21-, 4.3-, 6- and 6.6- fold higher, respectively, than in un-treated leaves. *PR10* and *LOX* genes reached a maximal level of transcript only 48 hours after PK₂ treatment with 5.9- and 11.7- fold induction, respectively.

Over the three days, the up-regulation on differentiated transcripts decreased rapidly from 100 to 0% between 72 and 96 hpt.

Defence-related genes expressions in PK₂-pretreated grapevine leaves inoculated with *P. viticola* or *E. necator*

In *Pv*-infected pre-treated leaves, 15.8 to 52.6% of genes were differentiated (Table 4 and Figure 2). At 24 hpi, 52.6 % of genes were differentially expressed with 70 % of up-regulations. Significant up-regulation of PR proteins (*PR1*, *PR3*, *PR6*, *PR10* and *PGIP*) as well as *CHI* and *CHORS* and significant down regulations of *PR2*, *STS* and *LDOX* genes were observed. At 48 hpi, the genes that were significantly modulated decreased (31.6 %) with 83.3 % of up-regulation concerning PR-protein transcripts (*PR1*, *PR3*, *PR6* and *PR10*), and a gene involved in indole pathways (*ANTS*). Only *CHORS* gene was significantly repressed (8.1 fold less than the control). At 72 hpi, only 15.8 % of genes were differentiated with 100 % which were still up-regulated (*PR3*, *PR6* and *PGIP*).

In *En*-infected leaves, above 40 % of studied genes were significantly modulated (36.8 or 42.1 %). At 24 hpi, 36.8 % of genes were differentially expressed, with 57.1% up regulated (Table 4). High significant down-regulations of *PR2*, *PR3*, *STS* and *CHI* genes were observed (22.8, 11, 4.8 and 27.2 fold lower than in control leaves, respectively) and significant over expression occurred for *PR6*, *PR8* and *PR10* genes with 14.1, 3.7 and 8.7 fold higher than in control leaves, respectively. At 48 hpi, 36.8 % of genes were differentially regulated. Only *PR2* and *ACC* genes were down-regulated and *PR6*, *PR10*, *STS*, *GST* and *ANTS* transcripts up-regulated. At 72 hpi, 42.1 % of genes were still significantly regulated and 75 % of them were up-regulated coding for PR proteins (*PR2*, *PR8*) or *PAL*, *STS* and *CHI* genes, involved in phenylpropanoid biosynthesis pathway.

The means of relative gene expressions over the three days showed that 7 genes on 19 were up-regulated in downy and powdery mildew defense response (Figure 3). The grapevine leaf protection triggered by PK₂ after *P. viticola* and *E. necator* inoculations was directly correlated with the mean of the relative expression of 19 genes (Figure 4). More than genes were up-regulated, more than the grapevine should be protected.

Effect of PK₂ Treatment on Stilbene Accumulations in Grapevine Leaves

The polyphenol content and the *trans*-form content (the main form found in leaves) of three major stilbenic phytoalexins, resveratrol, piceid and pterostilbene were quantified during 72 hours after pathogen inoculation with or without PK₂ pre-treatment (Figures 5, 6 and 7).

In PK₂ treated leaves, the polyphenol content was significantly increased over the three days ($310.05 \pm 35.09 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves), an increase 2.6-fold than in control leaves ($120.8 \pm 9.98 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves). In *P. viticola* and *E. necator* challenges, a significant accumulation of phenolic compounds occurred, with an increase of 2 to 3 fold than in control (243.4 ± 12.1 and $359.3 \pm 40.3 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves, respectively). Significant accumulations were observed in PK₂ pre-treated leaves after downy and powdery mildew inoculations. An increase of 2.7 to 3.1 folds than in control leaves was observed (328.84 ± 41.75 and $369.06 \pm 47.65 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves, respectively).

During the 72 h analysis, *trans*-piceid was quantitatively the most prolific stilbene produced in grapevine leaves.

In downy mildew experiments, control leaves contained 17.4 to 31.5 μg of *trans*-piceid per g of dried leaves and in control leaves of powdery mildew experiment contained from 8.0 to 43.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves. After powdery mildew inoculations, *trans*-piceid content increased significantly (from 45.8 to 59.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves). As PK₂ treatment alone led to an increase of piceid (between 41.7 to 50.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried weight in *En*-leaves and 38.4 and 30.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried weight in *Pv*-leaves). In *En*-infected leaves pre-treated with the PK₂, a significant accumulation of *trans*-piceid was observed at 24 and 48 hpi (58.4 and 36.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves, respectively) (Figures 7A). No *trans*-piceid significant accumulations were

observed after *Pv* inoculations in untreated leaves (18.3 to 32.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried weight) but in PK₂ pretreated leaves, a significant accumulation occurred 24 hpi (27.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried weight).

The *trans*-resveratrol content was very low in control grapevine leaves (0.01 to 1.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves). A significant accumulation was observed after downy and powdery mildew inoculations (2.7 to 8.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves). After PK₂ treatment at 0 and 72 hpi in untreated powdery mildew leaves (5.7 and 2.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves) or at 0, 24 and 72 hpi in untreated downy mildew leaves (3.1 and 4.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried weight). In *Pv*-infected leaves pre-treated with PK₂, a significant accumulation of *trans*-resveratrol was observed (1.0 and 1.43 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves) at 48 and 72 hpi, as in *En*-infected leaves pre-treated with PK₂ (1.9 to 4.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried weight).

Pterostibene was more abundant in downy mildew leaves ($4.21 \pm 0.84 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves) than in powdery ($0.65 \pm 0.37 \mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves), but at relatively lower levels compared to the quantity of the other phytoalexins. Significant accumulations were observed at 24 hpi in *Pv*- leaves PK₂-treated and no inoculated (4.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves), in untreated leaves and 24 hours after downy mildew inoculation (4.05 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves) and in *Pv*- leaves PK₂-treated and downy mildew inoculated (8.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves).

Globally, in *En*-infected leaves, after or not PK₂ treatment, *trans*-piceid and resveratrol contents were higher than in *Pv*-infected leaves. By contrast, pterostilben was higher in *Pv*-infected leaves than in *En*-infected leaves and this is correlated with the efficacy observed.

DISCUSSIONS

This study investigated the effect of a fertilizer (a phosphonate derivative) on the interaction between grapevine and two major biotrophic pathogens (*P. viticola* and *E.necator*). PK₂ treatment on grapevine leaves resulted in an increased resistance of grapevine to *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*. In this *in vitro* experiment, fungal development of *P. viticola* was reduced by 81.5 % compared to its growth on untreated leaves and the infection of *E. necator* was reduced at a lesser degree (27.9 %). The biological or chemical mechanisms of induced resistance by a fertilizer based on phosphonate derivative like PK₂ have rarely been analyzed, while the importance of the induced molecules related to resistance has been well documented (5-18).

The present study reveals that PK₂ enhanced the effective grapevine protection against an Oomycete (*P. viticola*) but also against an Ascomycete (*E. nector*) by leading the SAR, probably due to the accumulation of defense-related proteins and phytoalexins content depended on sampling time, on the pathogen..

The pretreatment with the PK₂ led light modifications at the transcriptional level in absence of the challenge of the pathogenic (7 genes on 19 are differentially expressed) while it led strong gene modulation of 17 genes 19 in downy and powdery mildew defense response during the three days. The pre-treated grapevine defense responses against a downy mildew attack led in a stronger over-expression of genes coding for the PR proteins (PR1, PR3, PR6, PR10 and PGIP) than those led in powdery mildew attack (PR6, PR8 and PR10).

In our study, we found no significant modulation of *PR2* gene in PK₂ pre-treated leaves while after pathogen challenge, a significant repression of *PR2* gene was obtained 24 hpi after downy mildew infection and 24 or 48 hpi after powdery mildew attack and only a significant over-expression was obtained 72 hours after powdery mildew infection. As regard chitinase genes (*PR3* and *PR8*) we obtained a significant accumulation of *PR3* gene was in defence response against downy mildew while it's significantly repressed in powdery mildew

infection and a significant accumulation of *PR8* gene in powdery mildew challenge while no modification was observed in interaction with downy mildew.

The identification of the *PR2* family as β 1-3-endoglucanases and the *PR3*, -4, -8 and -11 as endochitinases, as well as the *PR6* family as proteinase inhibitors, which could act against fungi. Since cell walls of fungi consist to chitine and glucanes, these encoding genes expression may inhibit fungal growth by degrading cell walls of the pathogen. This degradation by chitinases provides fragments of cell wall, which act as elicitors and primes the activation of another plant defence response which was more important in downy mildew interaction than in this of powdery mildew. The correlation of β 1-3 glucanase (*PR2*) and chitinase (*PR3* and *PR8*) activities with pathogen resistance has been well reported and both are thought to support defence against downy and powdery mildew (23). Chitinase genes are constitutively expressed in resistant plant whereas β 1-3 glucanase (*PR2*), probably the most important pathogenesis-related (PR) proteins related to resistance to downy mildew (24), was exclusively expressed after fungal challenge (25). The stimulation of grapevine defences by PK₂ seems to be more related to the modulation of chitinase genes (*PR3* and *PR8*) than to glucanase gene (*PR2*).

Polygalacturonase inhibitor proteins (*PGIP*) inhibit fungal endopolygalacturonases leading to the production of longer degradation products which acts as elicitors. *PGIP* was only significantly over expressed in response to downy mildew attack (26).

This modulation of the expression of these genes coding for PR proteins seems to explain, to her only, the grapevine protections obtained because we obtained either a higher or earlier over expression in downy mildew infection than in powdery mildew's. More the PR protein genes were over-expressed more the grapevine will be protected against pathogen attack (Figure 3).

The *PR1* family has been associated with activity against oomycetes and *PR10* transcript accumulation was observed after fungal challenge. In our study, we observed transcript accumulation of *PR10* in leaves PK₂-primed with fungal challenge as well in oomycete defence response as in this of ascomycete.

As regard *PR1* gene, we found only a significant induction after pathogen challenges in susceptible cultivar Cabernet Sauvignon stimulated by PK₂ in agreement with describe previously (27 et 28) which found *PR-1* induced, or not, in infected-leaves of susceptible cultivars.

The systemic acquired resistance induced by pathogen attack through the signaling pathway salicylic acid (SA) dependent (29) (SAR with *PR1*, *PR10* and *PR2*), while the induction of acquired resistance involves the jasmonic acid and ethylene (JA/ET) signaling pathway dependent (ISR with *PR3*, *PR4* or *PR8*) and we obtained both the modulation of *PR1*, *PR10*, *PR3* and *PR8* in the treated and inoculated leaves suggesting a cumulative effect of the ISR PK₂-induced and SAR induced by pathogens. SA and JA/ET signaling pathways play an important role in mode of action of PK₂ in *Vitis vinifera* in agreement with the dual mode of action of phosphonate derivatives (direct and indirect). Its direct action against pathogens leads to the pathogen degradation, releasing PAMPs (Pathogen associated Molecular patterns) recognized by the plant basal immune system. Secondly, by its indirect effect, PK₂ is able to stimulate the systemic acquired resistance by SA and JA/ET signaling pathways. It's the first work which is able to specify more clearly the mode of action as elicitor of a fertilizer in grapevine defense stimulation.

After PK₂ pre-treatment, *PAL* and *STS* transcripts were slightly up regulated after treatment accompanied with a rapidly increasing in total polyphenol and resveratrol contents just before pathogen challenges. Our results are in accordance with Nemestothy and Guest (10).

Amongst the genes coding for enzymes involved in the biosynthetic pathways of phenylpropanoids, only the *CHI* was strongly and significantly over-expressed in response to the defense of an attack of downy mildew while *STS* and *LDOX* were in response defense in that of the powdery mildew.

Stilbens, and particularly pterostilbene and viniferins, are strongly implicated in the resistance of grapevine to downy and powdery mildew (30-32). These compounds are typically produced in leaves and berries of grapevines, in response to stresses, which include fungal infection, UV irradiation and induction by chemicals (33).

Piceid and resveratrol were quantitatively the major stilbenes produced in grapevine leaves. In stress response, the piceid, the glycosylated form of resveratrol, constitute a pool of resveratrol. In our experimental procedure, we obtained a significant accumulation of piceide and resveratrol in response of downy and powdery mildew attack in absence of PK₂ pre-treatment.

Alonso-Villarde *et al* (34) obtained equally piceid and resveratrol accumulation only with pathogen inoculation and thought that they are not good resistance markers. Our results were in accordance to Pezet *et al* (35) because the response of the pathogen inoculation leads to a rapid stilbene synthase induction and an important resveratrol synthesis maintained after infection. Romero-Perez *et al* (36) have shown that the concentration of resveratrol and piceid in grape berry skins of susceptible cultivars of *V. vinifera* increased with the level of infection in the vineyards and thus demonstrated that the only accumulation of these compounds is not able to interrupt the pathogen growth.

Analysis of the expression of *STS*, a key enzyme in the biosynthetic pathway of stilbene, showed a significant over-expression 48 hours after an attack of powdery mildew in the leaves pretreated with PK₂ but there was an overall accumulation of metabolites of this pathway at 24 hours after the initial infection of powdery mildew.

This early accumulation of metabolites can be explained by an over-expression of the *STS* gene very early in the first hours, prior to the first sampling, not detected. We did not find significant over-expression of *PAL*, the first key enzyme in the phenylpropanoid biosynthetic pathway as it is commonly described because it occurring within 8 to 12 hours after infection (37). This phenomenon could explain the accumulation of secondary metabolites 24 hours before the *STS* over-expression. Despite the concept that phytoalexins are derived from distant precursors through *de novo* synthesis, previous studies (38) have suggested that preformed glycosides may represent a precursor pool for phytoalexin biosynthesis. A rapid *de novo* synthesis of β glucosidase (by induction of its expression), facilitating a releasing of prestored intermediates for the biosynthesis of phytoalexins.

Pterostilbene, the methylated form of resveratrol, is as toxic as viniferin against *P. viticola* was only identified in the samples in response to downy mildew infection. The present results showed that PK₂ treatment induced significant accumulation of pterostilbene in grapevine leaves (4.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves), as well as an inoculation with *P.viticola* (4.05 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves). No significant accumulation of pterostilbene was observed after powdery mildew infection. And the downy mildew inoculation in PK₂ pre-treated leaves induced the accumulation of pterostilbene 2 times higher than in untreated and inoculated or treated and no inoculated leaves (8.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried leaves). There is a cumulative effect of PK₂ treatment and downy mildew inoculation on pterostilbene accumulation.

The localization of stilbenic phytoalexins at the infection sites as well as their concentrations and the time-rate of their synthesis contribute the establishment of resistance mechanisms in grapevine (32). It could be important to note that viniferins were never identified in the samples in defense response to downy or powdery mildew infections.

Data, expressed per dried weight, seem to be in contradiction with the hypothesis that piceid and resveratrol are strongly implicated in the resistance of grapevine to powdery and downy mildews, because we observed that its accumulations occurred after pathogen challenge with or without PK₂ treatment.

Moreover, pterostilbene alone was found in high concentrations in PK₂ treated leaves 72 hours after *P. vitcola* infection, suggesting an important role of this compound in growth inhibition of this pathogen. Similarly, Slaughter *et al* (38) pointed to the involvement of pterostilbene in resistance against downy mildew after beta-aminobutyric induction. Our results showed a strong correlation between the accumulation of pterostilbene and the grapevine protection.

Many metabolites can be stored in the plant as conjugates inactive and can be activated by the hydrolysis of glucosidic bridges after alteration of the cell membrane. Naoumkina in 2007 (39) found that the defense response induced by methyl jasmonate in *Medicago truncatula* results from the induction of *de novo* synthesis of glucosidases, thus facilitating the re-release of stored pre-intermediate for the biosynthesis of defense compounds. This early accumulation of metabolites before the peak of expression of genes involved in metabolism could be explained by their quick retrieval from inactive conjugates.

The PR proteins act in conjunction with flavonoids and stilbenes directly on the pathogen (40). It would be interesting to search for and quantify other compounds from the secondary metabolism (flavonoids) as we have observed changes in the expression of genes coding for enzymes in their biosynthetic pathway (*CHI*, *CHS*, *LDOX*, *ANR*).

The PK₂-enhanced grapevine protection was probably due to the combination of over expression of defence related-genes coding mainly for PR proteins and pterostilbene accumulations. These results obtained in *Vitis vinifera* are in agreement with those obtained on tobacco by Nemethy and Guest (10) which found that fosetyl Aluminium, a phosphonate derivative enhanced sesquiterpenoid phytoalexin accumulation, *PAL* activity, lignin deposition and ethylene biosynthesis following inoculation.

This work gives an indication of the potential use of transcripts and stilbenes as markers of the defense status of grapevine leaves. Overall results indicate that modulation of defense gene regulation is often more marked after inoculation with *P. viticola* isolates and this could be in relation to the greater efficacy of grapevine defense on these pathogens.

From these results, the evaluation of effectiveness must be made in the vineyard to examine the effectiveness that can be expected and to assess the level of defense of the whole plant under field conditions *in natura*. Although the stimulating of defenses of plants present good reproducible efficiencies in controlled conditions in the laboratory, it turns out that the application of this method *in natura* seems more delicate and presents generally very variable efficiencies. Understanding the mechanisms and possessing markers of grapevine resistance status will be a prerequisite for inducer development in integrated pest management in the vineyard.

The results of the Cooke and Little (41) experiments indicate that a spraying program where phosphites are integrated with reduced applications of a systemic or non-systemic fungicide could help to suppress foliar and tuber late blight infection and overwinter survival of *P. infestans* in potato tubers.

The application of elicitor molecules appears promising as an alternative fungicide to fight downy and powdery mildew, but knowing that these treatments induce strong changes both at the molecular and biochemical level, one wonders what will be the impact of these new methods in terms of protection and quality of clusters. Tests were carried out in experimental vineyard to evaluate the effectiveness of this protection in natural conditions on foliage but also on the harvest produced at the end of the season (grape protections, yield, pH and acidity of musts and sugar contents).

ABBREVIATION USED

PR protein: Pathogenesis Related protein ; *EF1 γ* : γ chain of Elongation Factor 1 ; *PGIP*: Polygalacturonase Inhibiting Protein; *PAL*: Phenylalanine Ammonia Lyase; *STS*: Silbene Synthase; *CHI* Chalcone Isomerase; *CHS*: Chalcone Synthase; *LDOX* : Leucoanthocyanidin Oxydase ; *ANR* : Anthocyanidin Reductase ; *LOX* : Lipoxygenase ; *GST* : Gluthation *S*-transferase ; *ACC* : 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase ; *ANTS* : Anthranilate Synthase ; *CHORS* : Chorismate Synthase ; *CHORM* : Chorismate Mutase ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern ; SA/JA/ET : Salicylic Acid/Jasmonic Acid/Ethylen ; HPLC : High Performance Liquid Chromatography ; RTqPCR : quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction ; RNA : Ribonucleic Acid ; DNA : Deoxyribonucleic Acid ; cDNA : complementary DNA ; dNTP : Deoxynucleotide Triphosphates ; HCl : Hydrochloric acid ; EDTA : Ethylen Diamine-Tetraacetic acid ; CTAB : Cetyl Trimethylammonium Bromide ; PVPP : Polyvinyl Polypyrrolidone ; NaOAc : Sodium Acetate ; EtOH : Ethanol ; MeOH : Methanol ; SAR : Systemic Acquired Resistance ; ISR : Induced Systemic Resistance ; *Pv* : *Plasmopara viticola* ; *En* : *Erysiphe necator*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Bordeaux Wine Trade Council (CIVB) and INRA.

We are grateful to G. Taris and S. Gambier for their technical assistance and to J. Coulter for reading the English manuscript.

REFERENCES

1. Perfect, S. E.; Green, J. R.; O'Connell, R. J. Surface characteristics of necrotrophic secondary hyphae produced by the bean anthracnose fungus, *Colletotrichum lindemuthianum*. *European Journal of Plant Pathology* (2001), 107: 813-819
2. Corio-Costet, M. F. (ed) *Erysiphe necator*. Tec/Doc Lavoisier, Paris, (2007)
3. Walters, D.; Newton, A.; Lyon, G. Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. Blackwell Publishing, Oxford UK, (2007), pp 258
4. Zhao, J.; Davis, L. C.; Verpoorte, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* (2005), 23: 283-333
5. Smillie, R.; Grant, B. R.; Guest, D. The mode of action of phosphite - evidence for both direct and indirect modes of action on 3 *Phytophthora* Spp in plants. *Phytopathology* (1989), 79: 921-926

6. Guest, D.; Grant, B. The complex action of phosphonates as antifungal Agents. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* (1991), 66: 159-187
7. Jackson, T. J.; Burgess, T.; Colquhoun, I.; Hardy, G. E. S. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* (2000), 49: 147-154
8. Hardy, G. E. S.; Barrett, S.; Shearer, B. L. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology* (2001), 30: 133-139
9. Daniel, R.; Wilson, B. A.; Cahill, D. M. Potassium phosphonate alters the defence response of *Xanthorrhoea australis* following infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* (2005), 34: 541-548
10. Nemestothy, G. S.; Guest, D. I. Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1990), 37: 207-219
11. Fenn, M. E.; Coffey, M. D. Quantification of phosphonate and ethyl phosphonate in tobacco and tomato tissues and significance for the mode of action of 2 phosphonate fungicides. *Phytopathology* (1989), 79: 76-82
12. Fenn, M. E.; Coffey, M. D. Further evidence of the direct mode of action of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology* (1985), 75: 601-611
13. Guest, D. I. Modification of defence responses in tobacco and capsicum following treatment with fosetyl-Al aluminium tris (o-ethyl phosphonate). *Physiological Plant Pathology* (1984), 25: 125-134
14. Guest, D. I.; Upton, J. C. R.; Rowan, K. S. Fosetyl-Al alters the respiratory response in *Phytophthora-Nicotianae* var *Nicotianae*-infected tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1989), 34: 257-265
15. Bompeix, G.; Fettouche, F.; Saindrenan, P. Mode of action of phosethyl Al. *Phytiatrie-Phytopharmacie* (1981), 30: 257-272
16. Guest, D. I. Evidence from light-microscopy of living tissues that fosetyl-Al modifies the defense response in tobacco seedlings following inoculation by *Phytophthora-Nicotianae* var *Nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1986), 29: 251-261
17. Saindrenan, P.; Barchietto, T.; Avelino, J.; Bompeix, G. Effects of phosphite on phytoalexin accumulation in leaves of cowpea infected with *Phytophthora-cryptogea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1988), 32: 425-435
18. Saindrenan, P.; Barchietto, T.; Bompeix, G. Effects of phosphonate on the elicitor activity of culture filtrates of *Phytophthora-cryptogea* in *Vigna-unguiculata*. *Plant Science* (1990), 67: 245-251
19. Dercks, W.; Creasy, L. L. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara-viticola* grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1989), 34: 189-202.
20. Soyez, J. L. New phosphonates and potassium polyvalents for use in viticulture (1993-2001). *Progres Agricole et Viticole* (2001), 118: 487-490

21. Delye, C.; Corio-Costet, M. F. Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*: RAPD analysis discriminates two biotypes. *Mycological Research* (1998), 102: 283-288
22. Reid, K. E.; Olsson, N.; Schlosser, J.; Peng, F.; Lund, S. T. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development - art. no. 27. *Bmc Plant Biology* (2006), 6: 27-27
23. Giannakis, C.; Bucheli, C. S.; Skene, K. G. M.; Robinson, S. P.; Scott, N. S. Chitinase and β 1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection. *Australian Journal of Grape Wine Research* (1998), 4: 14-22
24. Becot, S.; Pajot, E.; Corre, D. I.; Monot, C.; Silue, D. Phytogard(R) (K₂HPO₃) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. *Crop Protection* (2000), 19: 417-425
25. Andreu, A. B.; Guevara, M. G.; Wolski, E. A.; Daleol, G. R.; Caldiz, D. O. Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. *Pest Management Science* (2006), 62: 162-170
26. Cervone, F.; Hahn, M. G.; Delorenzo, G.; Darvill, A.; Albersheim, P. Host-pathogen interactions- XXXIII- A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiology* (1989), 90: 542-548
27. Wielgoss, A.; Kortekamp, A. Comparison of PR1 expression in grapevine cultures after inoculation with a host- and a non-host pathogen. *Vitis* (2006), 45: 9-13
28. Legay, G.; Marouf, E.; Berger, D.; Neuhaus, J. M.; Mauch-Mani, B.; Slaughter, A. Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with *Plasmopara viticola* through suppression subtractive hybridation (SSH). *European Journal of Plant Pathology* (2011), 129: 281-301
29. Durrant, W. E.; Dong, X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* (2004), 42: 185-209
30. Pezet, R.; Perret, C.; Jean-Denis, J. B.; Tabacchi, R.; Gindro, K.; Viret, O. delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003), 51: 5488-5492
31. Adrian, M.; Jeandet, P.; Bessis, R.; Joubert, J. M. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl₃). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1996), 44: 1979-1981
32. Schnee, S.; Viret, O.; Gindro, K. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2008), 72: 128-133
33. Langcake, P. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon -viniferin, alpha -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* (1981), 18: 213-226
34. Alonso-Villaverde, V.; Viret, O.; Gindro, K. Downy mildew: is resistance linked to inoculum concentration? *Vitis* (2011), 50: 127-129
35. Pezet, R.; Gindro, K.; Viret, O.; Spring, J. L. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2004), 65: 297-303
36. Romero-Perez, A. I.; Lamuela-Raventos, R. M.; Andres-Lacueva, C.; de la Torre-Boronat, M. C. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in

grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001), 49: 210-215

37. Belhadj, A.; Telef, N.; Cluzet, S.; Bouscaut, J.; Corio-Costet, M. F.; Merillon, J. M. Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2008), 56: 5781-5787

38. Slaughter, A.; Hamiduzzaman, M. M.; Gindro, K.; Neuhaus, J. M.; Mauch-Mani, B. Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology* (2008), 122: 185-195

39. Naoumkina, M. Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceeding of National Academy of Science of USA* (2007), 104: 17909-17915

40. Busam, G.; Junghanns, K. T.; Kneusel, R. E.; Kassemeyer, H. H.; Matern, U. Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme a 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiology* (1997), 115: 1039-1048

41. Cooke, L. R.; Little, G. The effect of foliar application of phosphonate formulations on the susceptibility of potato tubers to late blight. *Pest Management Science* (2002), 58: 17-25

Table 1: Characteristics of *P. viticola* and *E. necator* isolates.

¹: famoxadone; ²: iprovalivarb; ³: mefenoxam. S=sensitive isolate, R=Resistant isolate.

Pathogen	Isolates	Locality of vineyard	Sampling year	Fungicide sensitivity		
				FAM ¹	I PRO ²	MEF ³
<i>P. viticola</i>						
<i>Pv</i> -R	MIC 128	Bordeaux	2005	R	R	S
<i>Pv</i> -S	COU 15	Bordeaux	2004	S	S	S
<i>E. necator</i>						
				Genetic group		
<i>En</i> -A	LLU 41	Pyrénées-orientales	2006		A	
<i>En</i> -B	PV 74	Pays de l'Aude	2006		B	

Table 2: Primer sets used for gene expression of grapevine.

Genes	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	GenBank N°
Elongation Factor 1- γ Chain (<i>EF1γ</i>)	GAAGGTTGACCTCTCGGATG	AGAGCCTCTCCCTCAAAAGG	AF176496
Phenylalanine ammonia lyase (<i>PAL</i>)	ACAACAATGGACTGCCATCA	CACTTTCGACATGGTTGGTG	X75967
Stilbene synthase (<i>STS</i>)	ATCGAAGATCACCCACCTTG	CTTAGCGGTTCGAAGGACAG	X76892
Leucoanthocyanidin dioxygenase (<i>LDOX</i>)	TGGTGGGATGGAAGAGCTAC	CCCACITGCCCTCATAGAAA	X75966
Anthocyanidin reductase (<i>ANR</i>)	CCTGCCITCAAGACTAGC	GGCCATCAGAGTAGGGATGA	VVI000166
Chalcone isomerase (<i>CHI</i>)	AGAAGCCAAAGCCATTGAGA	CCAAGGGGAGAATGAGTGAA	X75963
Chalcone synthase (<i>CHS</i>)	CCAACAATGGTGTGAGTTGC	CTCGGTCATGTGCTCACGT	X75969
PR protein class 1 (<i>PR1</i>)	CCCAGAACTCTCCACAGGAC	GCAGCTACAGTGTCTTCCA	AJ536326
PR protein class 10 (<i>PR10</i>)	GCICAAAGTGGTGGCTTCTC	CTCTACATCGCCCTTGGTGT	AJ291705
β 1,3 glucanase (<i>PR2</i>)	GGGAGATGTGAGGGGTAT	TGCAGTGAACAAAGCGTAGG	AF239617
Chitinase class IV (<i>PR3</i>)	TATCCATGTGTCTCCGGTCA	TGAATCCAATGCTGTITCCA	VVU97521
Serine protease inhibitor (<i>PR6</i>)	ACGAAAACGGCATCGTAATC	TCTTACTGGGGCACCATTTC	AY156047
Chitinase class III (<i>PR8</i>)	AATGATGCCCAAAACGTAGC	ATAAGGCTCGAGCAAGGTCA	Z68123
Polygalacturonase inhibitor protein (<i>PGIP</i>)	CCGGGAAAATCCCATATICT	AAGGTCCAACGACGTCAAAC	AF305093
Lipoxygenase 9 (<i>LOX</i>)	GACAAGAAGGACGAGCCTTG	CATAAGGGTACTGCCCGAAA	AY159556
Glutathione S- transferase (<i>GST</i>)	GGGATCTCAAAGGCAAAACA	AAAAGGGCTTGGGAGTAAT	AY156048
1-aminocyclopropane, 1-carboxylic acid oxidase (<i>ACC</i>)	GAAGGCCITTTACGGGTCTC	CCAGCATCAGTGTGTCTCT	AY211459
Anthranilate synthase (<i>ANTS</i>)	AAAAATCCAAGAGGGGTGCT	AAGCTTCTCCGATGCACTGT	XM002281597
Chorismate mutase (<i>CHORM</i>)	TCATTGAGAGGGCCAAATTC	AGGAGGCAGAAAAAGCATCA	FJ604854
Chorismate Synthase (<i>CHORS</i>)	GCCTTCACATGCAGATGCTA	CTGCAACTCTCCCAATGGTT	FJ604855

Table 3: Relative expression of defense-related genes that are significantly induced (***bold and italic***) in leaves after PK₂ treatment in comparison with controls un-inoculated at the threshold of 0.05 %.

	24 hpt	48 hpt	72 hpt	96 hpt
<i>PR1</i>	3.53	3.81	-1.29	1.13
<i>PR2</i>	2.63	3.07	1.41	4.06
<i>PR3</i>	1.37	-1.80	1.08	1.45
<i>PR6</i>	4.02	3.66	2.68	-1.35
<i>PR8</i>	2.27	2.48	1.96	1.36
<i>PR10</i>	3.50	5.94	2.63	1.22
<i>PGIP</i>	3.09	2.41	-1.08	1.25
<i>PAL</i>	1.10	1.06	3.74	1.64
<i>STS</i>	2.15	3.85	1.44	4.20
<i>CHI</i>	2.48	-2.04	-2.50	1.20
<i>CHS</i>	-1.31	-1.02	1.10	2.42
<i>LDOX</i>	1.12	5.27	2.20	1.05
<i>ANR</i>	-1.03	2.73	-2.35	-1.20
<i>LOX</i>	-1.75	11.67	1.74	-1.68
<i>GST</i>	21.13	8.79	13.83	2.79
<i>ACC</i>	-1.18	1.59	-2.50	2.83
<i>ANTS</i>	4.31	-1.09	4.31	1.05
<i>CHORM</i>	6.00	6.22	2.44	-1.02
<i>CHORS</i>	6.62	1.68	1.47	-1.37
% of differentiated genes	26.3	68.4	10.5	0.0
Relative % of up regulated genes	100.0	100.0	100.0	0.0

Table 4: Relative expression of defense-related genes that are significantly induced (***bold and italic***) or repressed (*underlined and italic*) in PK₂ pre-treated leaves after inoculation in comparison with controls inoculated at the threshold of 0.05.

	<i>Plasmopara viticola</i>			<i>Erysiphe necator</i>		
	24 hpi	48 hpi	72 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi
<i>PR1</i>	3.08	3.39	1.66	1.17	1.74	1.72
<i>PR2</i>	<u>-7.41</u>	-1.04	-1.44	<u>-22.82</u>	<u>-3.11</u>	4.55
<i>PR3</i>	33.30	4.10	3.50	<u>-11.04</u>	3.61	1.12
<i>PR6</i>	6.07	17.33	5.22	14.12	7.01	1.62
<i>PR8</i>	-1.29	1.80	-1.49	3.70	2.48	2.85
<i>PR10</i>	14.05	4.37	1.40	8.70	2.76	1.64
<i>PGIP</i>	26.15	-1.78	3.31	-1.09	1.79	-1.48
<i>PAL</i>	2.91	-1.02	1.84	1.11	1.29	3.16
<i>STS</i>	<u>-2.54</u>	-2.37	1.72	<u>-4.83</u>	35.50	2.91
<i>CHI</i>	26.97	1.74	1.28	<u>-27.24</u>	3.17	<u>-3.17</u>
<i>CHS</i>	1.18	1.56	1.83	1.92	1.77	2.76
<i>LDOX</i>	<u>-9.08</u>	2.13	-1.32	1.20	2.39	6.13
<i>ANR</i>	1.19	1.06	1.06	2.42	-4.65	-1.79
<i>LOX</i>	1.53	-1.45	1.68	-19.40	1.83	<u>-8.19</u>
<i>GST</i>	1.53	1.04	1.30	1.68	2.79	-1.85
<i>ACC</i>	2.85	1.06	-2.15	-18.36	<u>-3.01</u>	2.01
<i>ANTS</i>	1.32	8.77	1.70	2.51	2.88	2.07
<i>CHORM</i>	1.32	-1.42	1.05	27.36	-2.13	2.73
<i>CHORS</i>	3.93	<u>-8.14</u>	1.24	1.94	-1.30	1.78
% of differentiated genes	52.6	31.6	15.8	36.8	36.8	42.1
Relative % of up regulated genes	70	83.3	100	57.1	71.4	75

Figure legends

Figure 1: Protection of grapevine detached leaves in response to PK₂ treatment against *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*. PK₂ (3.18 mM) was sprayed 24 hours before pathogen inoculations. Diseases were assessed 7 and 12 days post-inoculation for downy and powdery mildew respectively and expressed as the percentage of growth inhibition. Results represent the mean ± standard deviations. Statistical analysis was performed using variance analysis using the statistical software Systat 11 (Systat Software, Inc) and significant differences were determined by Tuckey's honest significant difference (HSD) test at level of $P \leq 0.05$.

Figure 2: Relative gene expression in infected leaves with different isolates of *Plasmopara viticola* (Pv) and *Erysiphe necator* (En), without (A) or with PK₂ pre-treatment (B). Each column represents the time point after pathogen inoculation (24, 48 or 72 hpi) and each line corresponds to one gene represented by a single row of boxes. The colour scale bars represent the ratio values corresponding to the mean of two independent experiments. Genes with a higher expression level appear in red with a colour gradient, while those with lower intensity appear in blue (in white no change in gene expression compared to respective control uninoculated and without treatment at each time and at each foliar stage). In Fig. 3B, the columns corresponding to PK₂ treatment alone represent the mean of the relative gene expression of the different foliar stages of the two independent experiments.

Figure 3: Means of relative expression of defense-related genes during three days in PK₂ pre-treated leaves after inoculation in comparison with controls untreated and no inoculated. Values which are significantly induced at the threshold of 0.05% were bold underlined. Data corresponded at the mean of 4 independent experiments for *E. necator* and *P. viticola*.

Figure 4: Correlation between the mean of relative gene expressions and leaves protection triggered by PK₂ against downy and powdery mildew.

Figure 5: HPLC quantification of polyphenols content in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to PK₂ treatment with or without pathogen inoculations. Grapevine leaves were pre-treated 24 hours before downy and powdery mildew inoculations with 3.18 mM of PK₂. Results represent the means (± standard deviations) of four experiments. Stars represent the values significantly different from controls at the threshold of 0.05 %.

Figure 6: HPLC quantification of three *trans*-stilbenes in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to PK₂ treatment with or without *P. viticola* inoculations. Grapevine leaves were pre-treated 24 hours before downy and powdery mildew inoculations with 3.18 mM of PK₂. (A) *trans*-piceid. (B) *trans*-resveratrol and (C) pterostilbene. Results represent the means (± standard deviations) of four experiments. Stars represent the values significantly different from controls at the threshold of 0.05 %. (□) control; (▢) PK₂ treatment; (▨) Pv-infected leaves; (■) Pv-infected leaves and PK₂ treatment.

Figure 7: HPLC quantification of three *trans*-stilbenes in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to PK₂ treatment with or without *E. necator* inoculations. Grapevine leaves were pre-treated 24 hours before downy and powdery mildew inoculations with 3.18 mM of PK₂. **(A)** *trans*-piceid. **(B)** *trans*-resveratrol and **(C)** pterostilbene. Results represent the means (\pm standard deviations) of four experiments. Stars represent the values significantly different from controls at the threshold of 0.05 %. (□) control; (▨) PK₂ treatment; (▤) *En*-infected leaves; (■) *En*-infected leaves and PK₂ treatment.

Fig. 1. Protection of grapevine detached leaves in response to PK₂ treatment against *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*.

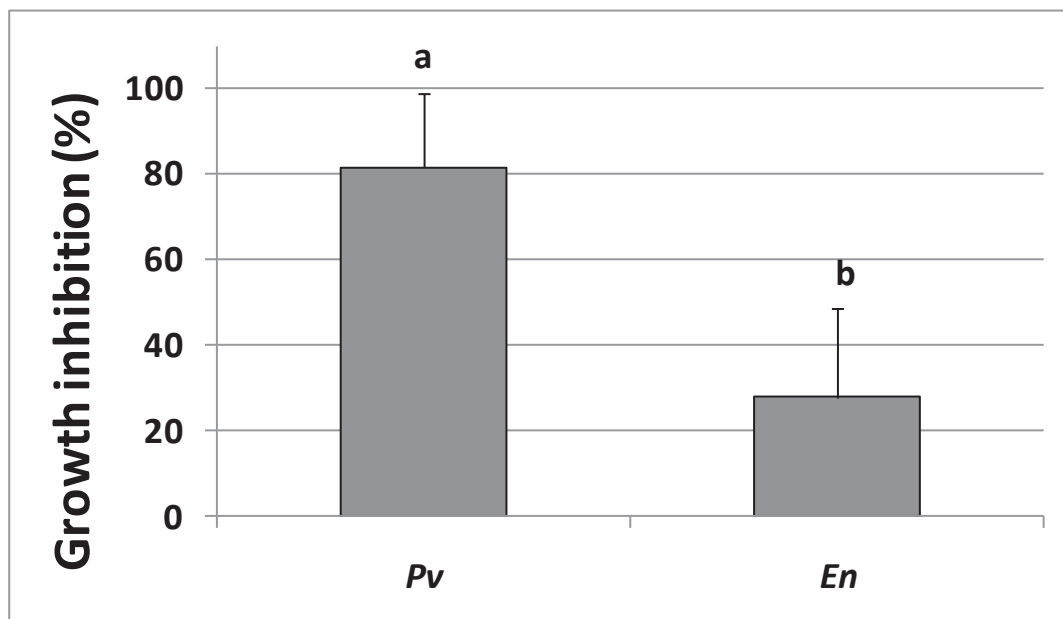


Fig. 2. Relative gene expression in infected leaves with different isolates of *Plasmopara viticola* (Pv) and *Erysiphe necator* (En), without (A) or with PK₂ pre-treatment (B).

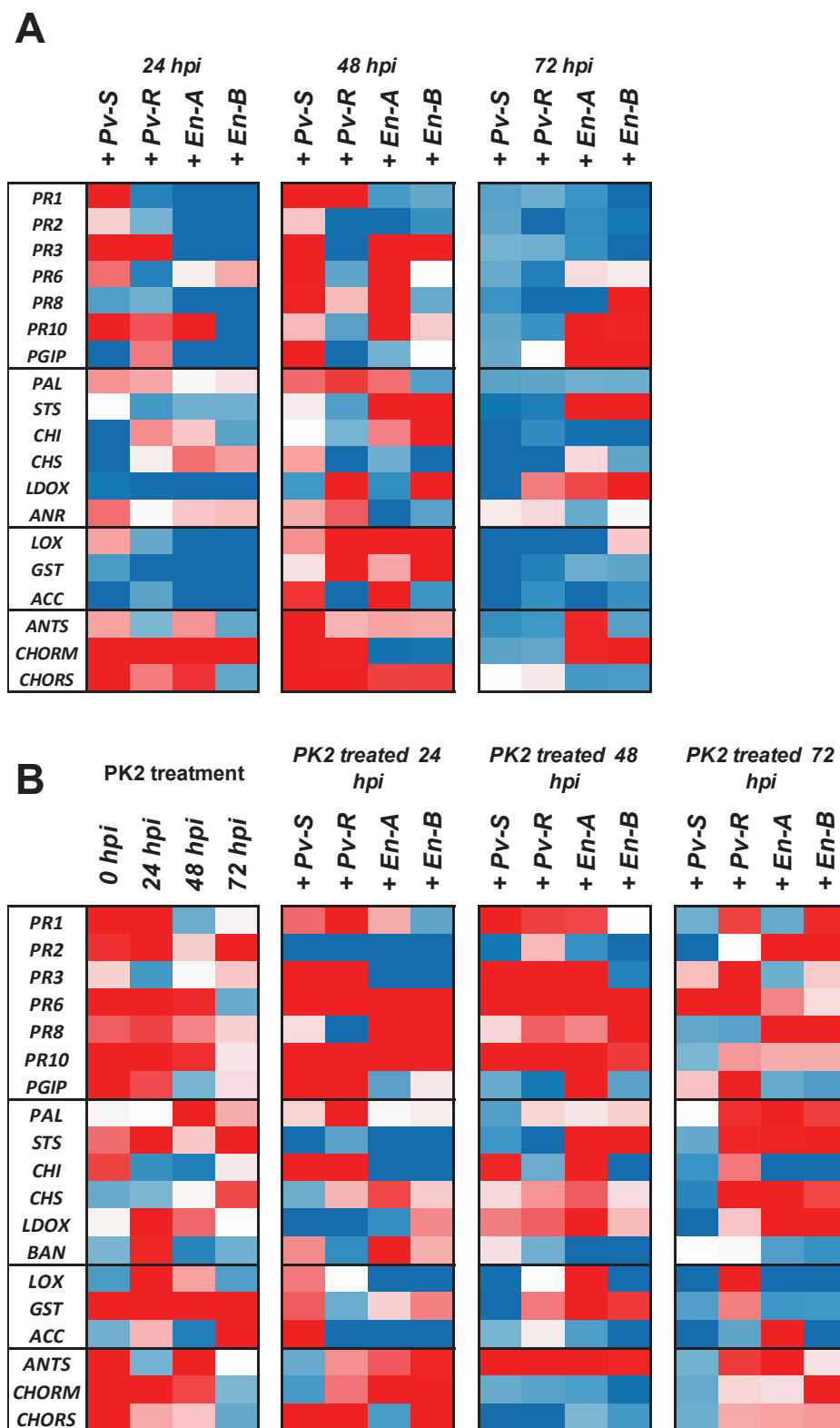


Fig. 3. Means of relative expression of defense-related genes during three days in PK₂ pre-treated leaves after inoculation in comparison with controls untreated and no inoculated.

	+ Pv	+ En
<i>PR1</i>	<u>2,71</u>	1,54
<i>PR2</i>	-1,68	1,64
<i>PR3</i>	<u>13,63</u>	1,61
<i>PR6</i>	<u>9,54</u>	<u>7,58</u>
<i>PR8</i>	1,08	<u>3,01</u>
<i>PR10</i>	<u>6,61</u>	<u>4,37</u>
<i>PGIP</i>	<u>10,01</u>	1,13
<i>PAL</i>	1,91	1,86
<i>STS</i>	-1,18	<u>12,87</u>
<i>CHI</i>	<u>10,00</u>	1,17
<i>CHS</i>	1,52	2,15
<i>LDOX</i>	1,00	<u>3,24</u>
<i>BAN</i>	1,10	1,07
<i>LOX</i>	1,30	-1,50
<i>GST</i>	1,29	1,67
<i>ACC</i>	1,46	-1,25
<i>ANTS</i>	<u>3,93</u>	<u>2,49</u>
<i>CHORM</i>	1,03	<u>34,37</u>
<i>CHORS</i>	1,76	1,49

Fig. 4. Correlation between the mean relative gene expressions (■) and leaves protection (% of growth inhibition (■) triggered by PK₂ against downy and powdery mildew.

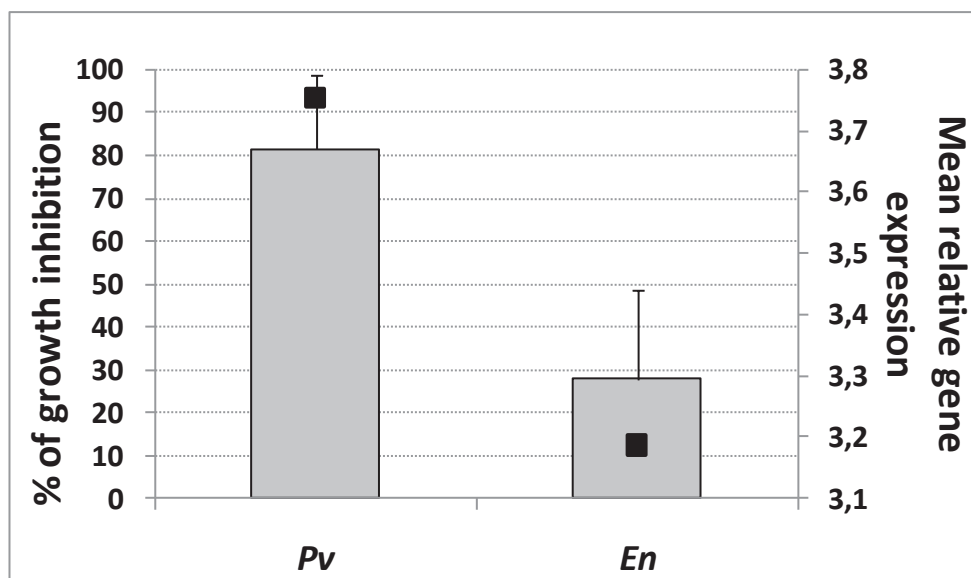


Fig. 5. Quantification of polyphenol content in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to PK₂ treatment with or without pathogen inoculations.

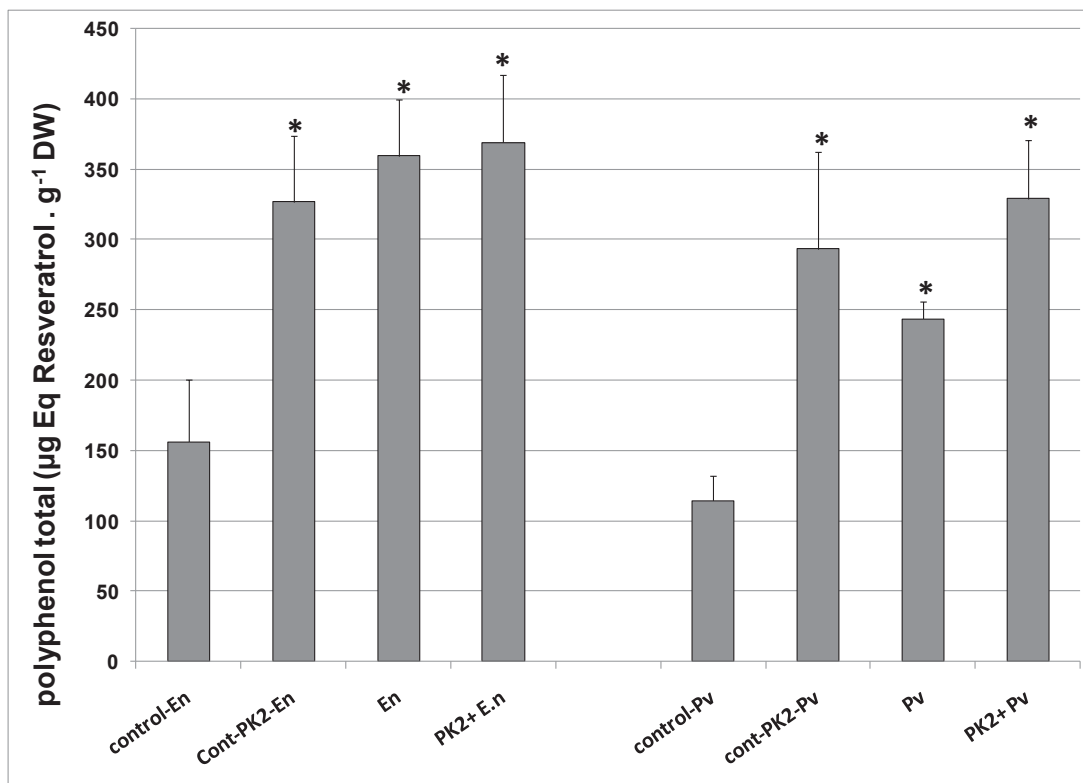


Fig. 6. HPLC quantification of three *trans*-stilbenes in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to PK₂ treatment with or without *P. viticola* inoculations.

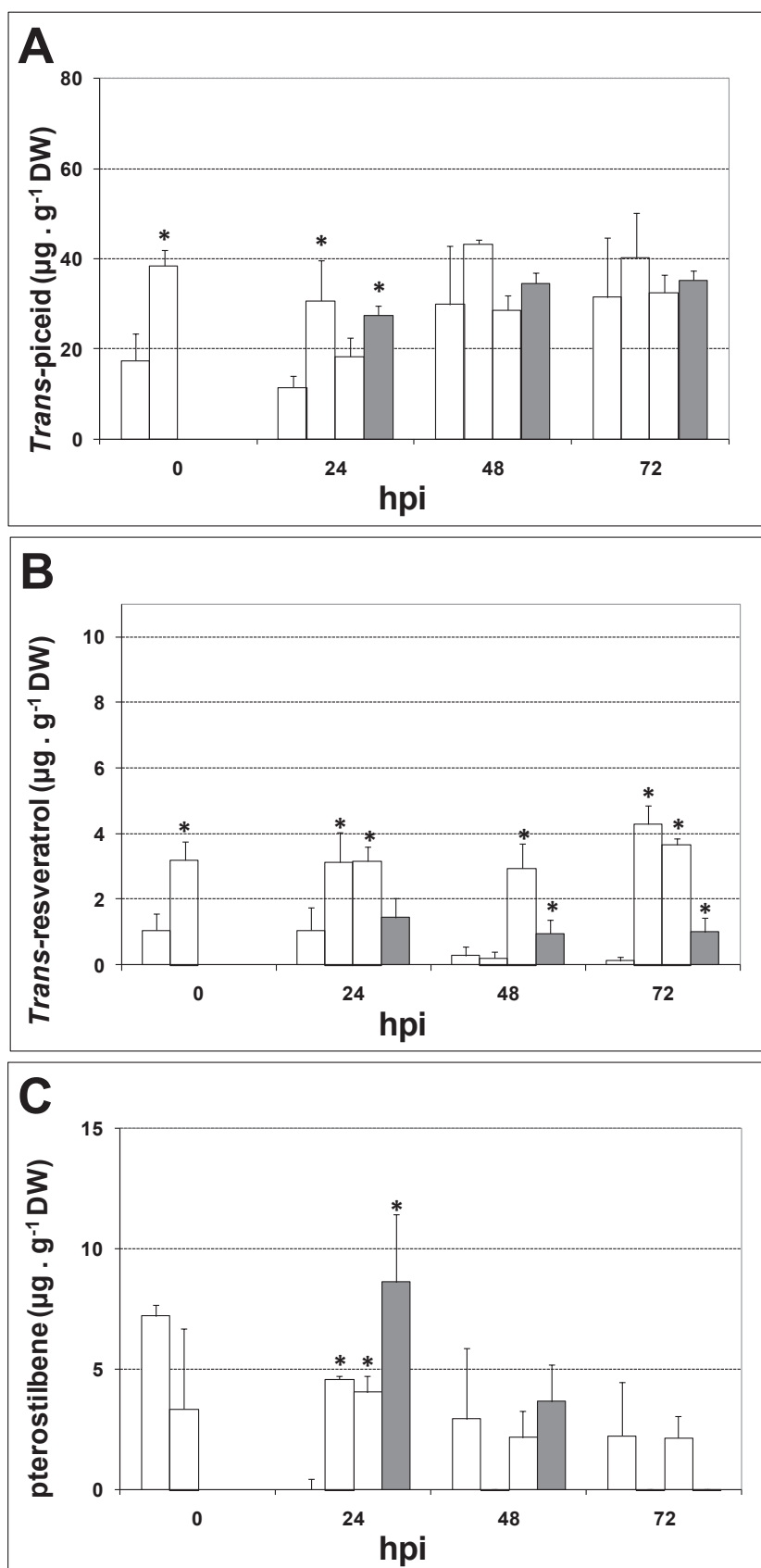
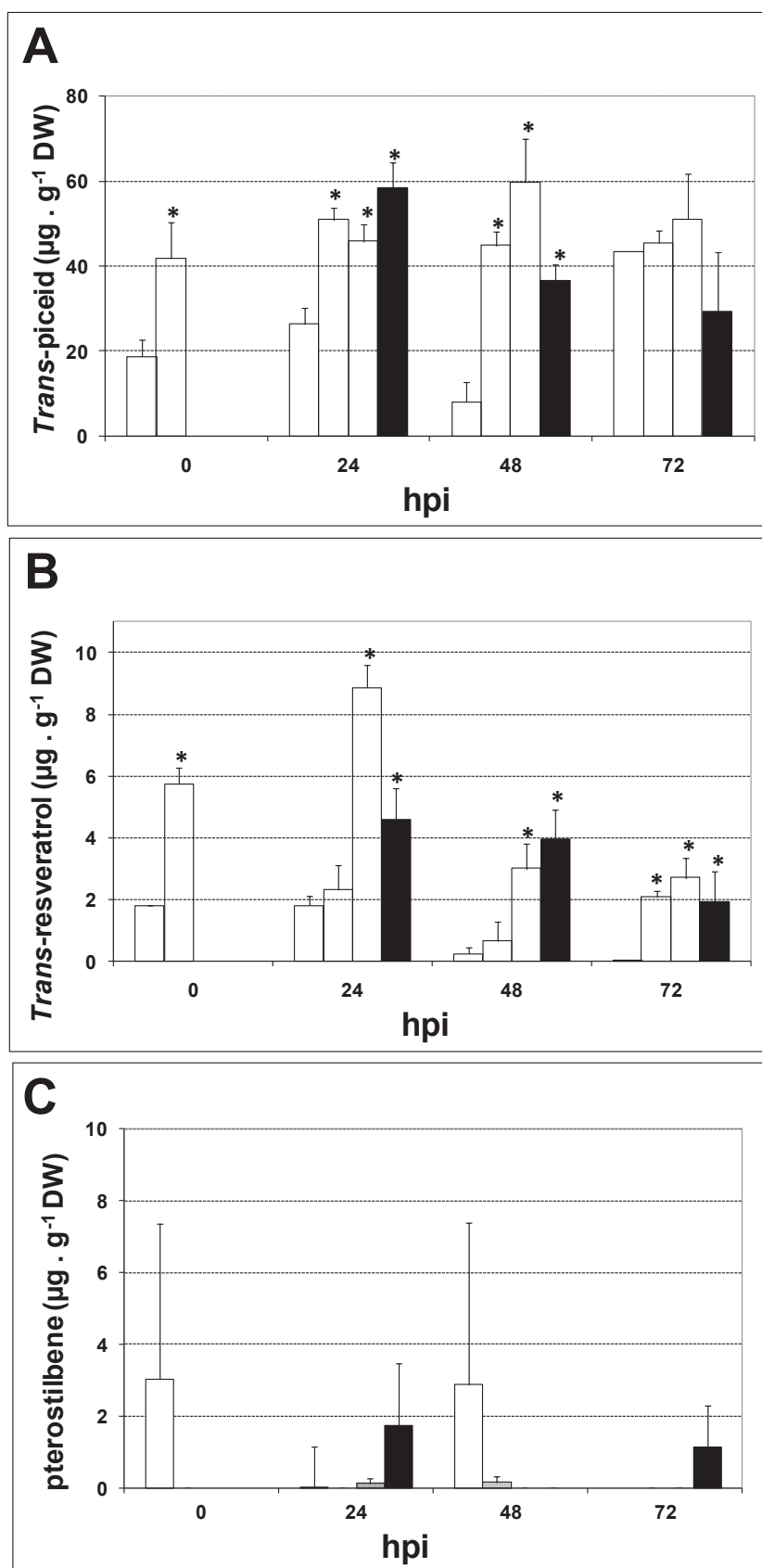


Fig. 7. HPLC quantification of three *trans*-stilbenes in *Vitis vinifera* (L.) cv Cabernet Sauvignon leaves in response to PK₂ treatment with or without *E. necator* inoculations.



3. Conclusions

L'objectif principal de ce travail visait à préciser le rôle de phosphonates tels que le PK₂ et le fosétyl-Al dans l'élicitation des défenses de la vigne contre deux agents pathogènes biotrophes majeurs (*E. necator* et *P. viticola*). La comparaison des réponses de la plante, obtenue après élicitation avec les phosphonates, a été comparée à celle obtenue après une stimulation avec le BTH, et devait nous permettre de mieux comprendre le potentiel éliciteur de ces molécules.

Nous avons évalué dans un premier temps, le niveau de protection apportée par les traitements à l'aide d'une gamme de concentrations de BTH, FOS et PK₂ (de 0 à 1500 mg/L), que nous avons testé sur 19 souches d'oïdium appartenant aux deux groupes génétiquement distincts (A et B) et sur 6 souches de mildiou présentant des caractéristiques phénotypiques différentes (résistances aux fongicides, agressivité) afin d'appréhender l'impact de la diversité des agents pathogènes sur l'efficacité des traitements.

Mes résultats montrent sans ambiguïté que l'efficacité des réponses de la vigne varie selon l'éliciteur utilisé mais également selon la variabilité de l'agent pathogène considéré.

La comparaison des différentes valeurs des ED₅₀ obtenues (Tableau 19) montre que les trois produits présentent tous une meilleure efficacité anti-mildiou, qu'anti-oïdium. Le PK₂ apporte une protection à la vigne plus modérée contre l'ensemble des pathogènes. Les trois produits induisent une efficacité de protection similaire contre le mildiou sans distinction des isolats. Le BTH, quant à lui, protège la vigne efficacement quel que soit le pathogène considéré. En revanche, les phosphonates révèlent des efficacités bien différentes. Ainsi le FOS apporte-t'il une efficacité significativement plus faible contre l'oïdium de groupe A que contre l'oïdium B. Globalement une moindre efficacité des phosphonates contre les oïdiums est observée. A noter, que Speiser *et al.*, (2000) avait constaté que le phosphonate de potassium était efficace contre le mildiou, mais pas contre l'oïdium. Le fait nouveau est certainement la moindre sensibilité des souches d'oïdium de groupe A au FOS.

Dans cette étude, nous avons observé aucun effet direct du BTH, même à de fortes concentrations, sur la croissance mycélienne et la production de spores de *P. viticola* et *E. necator*, en accord avec ce qui est couramment décrit (Freidrich *et al.*, 1996 et Görlach *et al.*, 1996). En revanche, pour les phosphonates, conformément à leur mode d'action, ils présentent bien une activité fongitoxique sur l'oomycète *P. viticola* et de façon plus surprenante sur l'ascomycète *E. necator*.

Tableau 19 : Comparaison des ED₅₀ obtenues après traitement avec le BTH, fosétyl et PK₂.

	Valeurs de ED ₅₀ (mM)		
	BTH	FOS	PK ₂
Mildiou R	0,47 ± 0.06	0,52 ± 0.04	1,27 ± 0.02
Mildiou S	0,53 ± 0.13	0,48 ± 0.07	0,64 ± 0.08
Oïdium A	1,05 ± 0.28	3,30 ± 0.46*	7,44 ± 1.38*
Oïdium B	2,00 ± 0.10	0,89 ± 0.32	6,36 ± 1.53*

* valeur significative au seuil de 5%.

Les données présentées dans cette étude démontrent que les produits testés protègent la vigne efficacement contre des infections de mildiou et d'oïdium en induisant une résistance systémique acquise. En effet, la vigne module ses défenses en réponse à l'application des stimulateurs au niveau moléculaire en surexprimant un ensemble de gènes de défense, mais

leurs expressions varient selon la molécule utilisée. Nous montrons de surcroît que l'agressivité ou les particularités génétiques ou phénotypiques des agents pathogènes interagissent également.

Les produits appliqués sur les feuilles induisent très rapidement, 24 ou 48 heures après traitement, des modifications au niveau moléculaire. Le BTH induit des modifications plus importantes que les phosphonates, puisqu'il induit, 24 heures après traitement, la sur-expression de 13 gènes sur les 23 étudiés alors que ces derniers induisent en 48 heures, la sur-expression de seulement 8 d'entre-eux (Figure 32).

Quel que soit le stimulateur utilisé, nous remarquons que 7 gènes se retrouvent communément sur-exprimés 24 heures après le traitement, lesquels codent pour 3 PR-protéines (*PR1*, *PR10* et *PGIP*), trois enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des composés indoliques (*ANTS*, *CHORM* et *CHORS*) et la *GST* intervenant dans le maintien du status rédox de la plante (Figure 32). Quarante huit heures après traitement, une sur-expression commune de *PR1*, *PR10* et *CHORM* est observée en réponse à l'élicitation des trois produits.

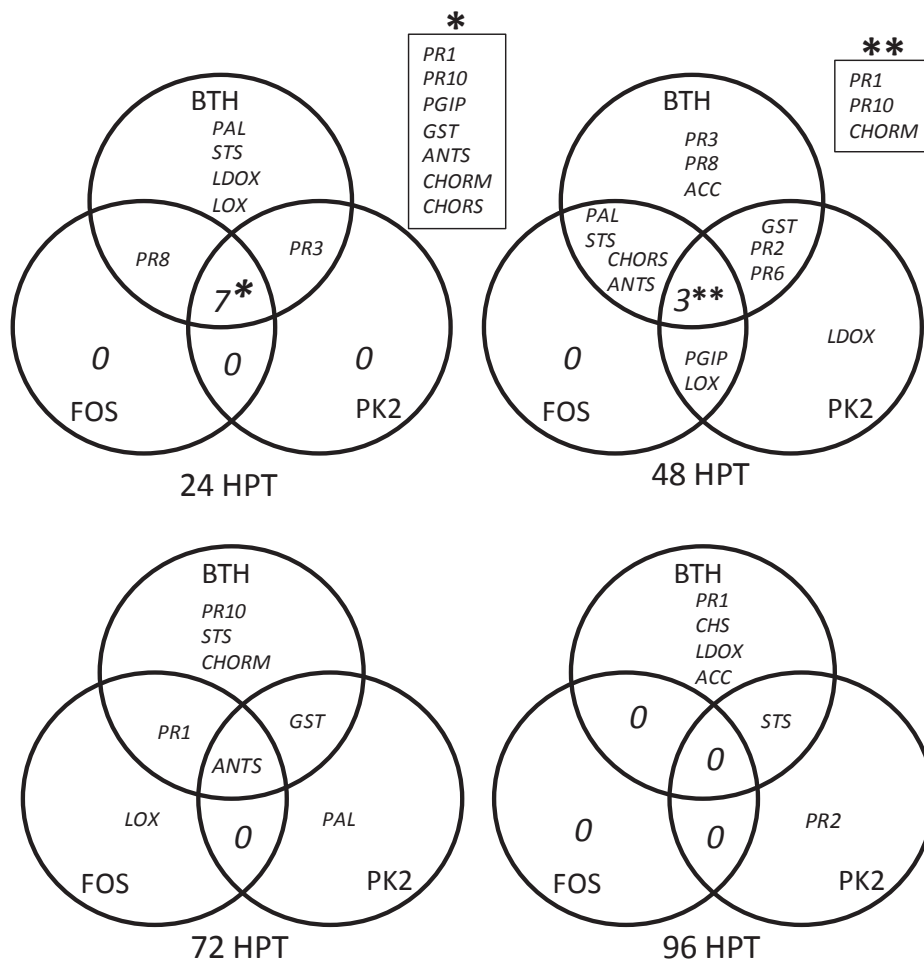


Figure 32: Diagramme de Venn représentant les surexpressions des gènes de feuilles de vigne 24, 48, 72 et 96 heures après traitement avec le BTH, FOS et PK₂.

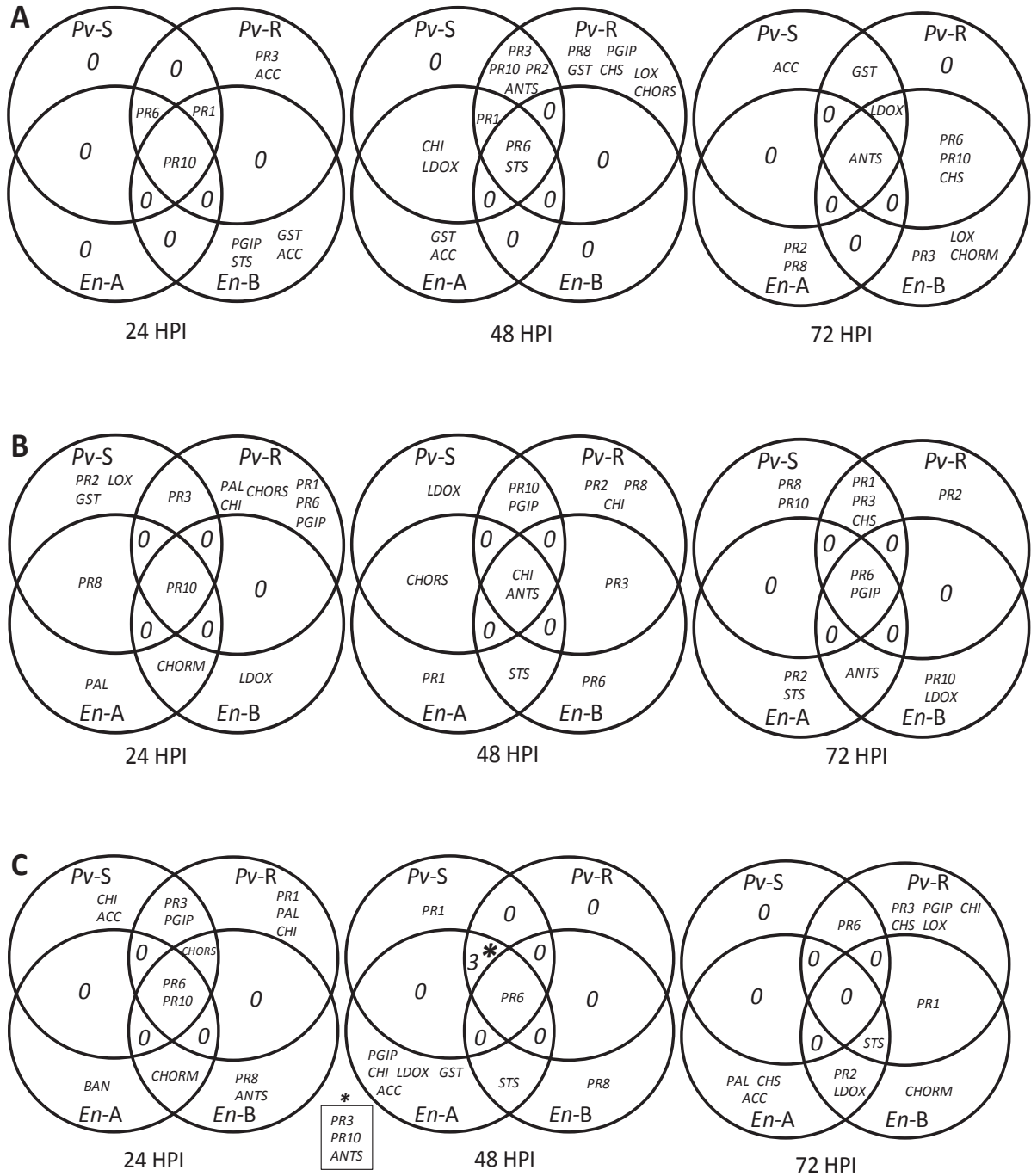


Figure 33: Diagramme de Venn représentant les surexpressions de gènes dans les feuilles de vigne prétraitées avec (A) le BTH ; (B) le FOS et (C) le PK₂ en réponse à une attaque de mildiou sensible (*Pv-S*) ou résistant (*Pv-R*) au fongicide ou d'oidium de groupe A (*En-A*) ou de groupe B (*En-B*).

Sur l'ensemble de la période d'étude, la vigne stimulée par le BTH, le FOS et le PK₂ induit la surexpression de *PR6*, *PR10* et *ANTS* en réponse de défense de tous les pathogènes étudiés (Figure 33), puis une sur-expression de *PR1* et *PR3* en réponses à une attaque de mildiou (*Pv-S* et *Pv-R*) ou une sur-expression de *STS* et *CHORM* en réponse à une attaque d'oïdium (*En-A* et *En-B*). Le BTH seul induit une surexpression de *STS* en réponse à l'attaque des 4 espèces de pathogènes et le fosétyl induit la surexpression de *CHI* et *PGIP* lors de la défense de la vigne contre tous les pathogènes. Les souches d'oïdium B et de mildiou résistantes aux fongicides semblent conduire la plante à mettre en place des régulations plus importantes que celles mises en place pour les souches plus sensibles aux fongicides (*En-A* et *Pv-S*) pour limiter leur développement (Figure 33). Il semble que la plante réagisse d'autant plus intensément que les souches soient agressives. En effet, comme les souches d'oïdium de groupe A ont été montrées moins agressives que les souches de groupe B en termes de germination et d'efficacité d'infection (Montarry *et al.*, 2009), il est plausible de faire cette hypothèse. De manière similaire, la souche de mildiou utilisée, résistante aux fongicides (*Pv-R*), présente un indice de fitness (FI=2,15) supérieur à la souche sensible (*Pv-S*, FI= 1,78) (Corio-Costet *et al.*, 2011), avec un fort potentiel d'infection. Dans ce cas également nous notons une meilleure efficacité des défenses de la vigne sur cette souche. Toutefois, pour la souche de mildiou résistante, sa résistance aux fongicides de type CAA (inhibiteur de la biosynthèse de la paroi fongique) pourrait éventuellement la rendre plus sensible aux défenses mises en œuvre par la vigne. A noter également, le peu de gènes communs exprimés par la vigne, en réponse aux attaques des deux types de souches, et ce quel que soit l'éliciteur utilisé.

A noter également, le peu de gènes communs exprimés par la vigne, en réponse aux attaques des deux types de souches, et ce quel que soit l'éliciteur utilisé.

Une sur-expression de *PGIP* est observée dans les feuilles traitées avec les phosphonates (FOS et PK₂) en réponse à une attaque de mildiou (*Pv-S* et *Pv-R*). Les polygalacturonases, produites par les champignons, sont des enzymes qui dégradent la pectine des parois végétales lors du processus de colonisation (Kortekamp *et al.*, 2006). Les *PGIP* doivent jouer un rôle plus important dans les défenses de la vigne contre le mildiou, un oomycète endoparasite, pour inhiber sa croissance que contre l'oïdium, un champignon ectoparasite. En effet, du fait de leur appartenance à un autre phylum que les champignons, la paroi cellulaire des oomycètes est connue pour contenir de la cellulose, et des glucanes (gluco-, xylo- et manno- glucanes) des composés différents de ceux communément rencontrés chez les champignons.

Les réponses de défenses induites par les trois éliciteurs, en réponse à une attaque de mildiou, conduisent à une sur-expression généralisée de *PR3* (Figure 33), une PR protéine ayant une activité chitinase, appartenant à la classe IV. Ce qui peut paraître surprenant si l'on tient compte de la littérature qui décrit les oomycètes comme ne contenant pas de chitine. Néanmoins, l'action co-jointe de chitinases et glucanases doit intervenir dans l'efficacité des défenses de la plante contre le mildiou. De plus, les enzymes agissant directement sur le pathogène induisent la dégradation de la paroi fongique et libèrent des fragments qui peuvent aussi induire l'activation des défenses.

Un ensemble de gènes a été indentifié comme marqueurs de la SAR médiée par la voie de l'acide salicylique (Ward *et al.*, 1991 et Friedrich *et al.*, 1996) et induits de façon coordonnée codant pour *PR1*, *PR2*, *PR5* et *PR10*. En revanche, les gènes codant pour des chitinase (*PR3*, *PR4* et *PR8*) sont couramment utilisés comme marqueurs de réponses de défenses médiées par l'acide jasmonique et l'éthylène. Nos résultats obtenus montrent que le BTH et les phosphonates induisent une résistance systémique acquise par sur-expression de gènes potentiellement SA-dépendants comme décrits dans la littérature, mais induisent aussi

la sur-expression de chitinases (*PR3* et/ou *PR8*), marqueur supposé provenir d'une signalisation passant par les voies de l'acide jasmonique et de l'éthylène. Perazzolli *et al.*, (2011) a obtenu une surexpression de *PR4*, une PR protéine marqueur de la voie de l'acide jasmonique (Hamiduzzaman *et al.*, 2005) après traitement avec le BTH. Nous montrons aussi dans notre étude que la voie de l'éthylène (transcripts ACC), après un traitement avec le BTH ou les phosphonates semblent également intervenir.

Les métabolites secondaires produits par les plantes sont des éléments nécessaires à leur développement et pour leurs réponses à des changements environnementaux. L'analyse de l'expression du gène *STS*, enzyme clé de la voie de biosynthèse des stilbènes, montre une sur-expression significative, 48 heures après une attaque d'oïdium et de mildiou dans les feuilles prétraitées avec les trois produits, et nous observons globalement une accumulation des métabolites issus de cette voie dès 24 heures après une infection d'oïdium. Cette accumulation rapide de métabolites pourrait résulter d'une sur-expression du gène *STS* précoce dès les premières heures, qui ont précédé le premier prélèvement de 24 heures et que nous n'avons pas pu déceler. En revanche, nous n'avons pas trouvé de sur-expression significative de la *PAL*, la première enzyme clé de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Couramment décrite comme survenant dans les 8 à 12 heures après l'infection (Latunde-Dada *et al.*, 2001 et Belhadj, 2008), ce phénomène non perçu dans notre étude pourrait expliquer cette accumulation de métabolites secondaires 24 heures avant le deuxième pic de sur-expression observée. L'augmentation observée des polyphénols en amont du pic d'expression des enzymes clé de la voie de biosynthèse pourrait également être due à une métabolisation des ressources disponibles. Ainsi, l'accumulation de pterostilbène résulterait-elle d'une méthylation du resvératrol ou picéide. La reconnaissance précoce de pathogènes et la vitesse de synthèse ou de métabolisation des stilbènes pourraient être essentielles dans la définition du niveau de résistance contre le mildiou.

En plus des phénylpropanoïdes, les alcaloïdes, isoflavonoïdes, la lignine et les dérivés de l'indole pourraient jouer un rôle important dans la résistance aux pathogènes (Hu *et al.*, 2009). Suite au travail de J. Bouscalt (2005), qui identifiait des composés, à noyau indolique de type tryptophane, accumulés dans les feuilles traitées avec le BTH, nous nous sommes intéressées à cette voie de biosynthèse, par homologie à celle d'*Arabidopsis thaliana*. En effet, chez cette plante modèle, l'induction de la synthèse de camalexine, un composé dérivé du métabolisme du tryptophane, ou de la scopolétine (un isoflavonoïde) représente une part importante des mécanismes de défenses en réponse à une attaque de pathogène, laquelle implique des voies de signalisation dépendante de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique ou de l'éthylène (Figure 34) (Beets et Dubery, 2011). De plus, la chorismate synthase (*CHORS*), anthranilate synthase (*ANTS*), et chorismate mutase (*CHORM*) sont des gènes différentiellement exprimés lors d'interactions compatibles et incompatibles de l'orge avec *B. graminis* f. sp. *hordei* (Hu *et al.*, 2009) (Fig. 34). En présence d'agents pathogènes, dans notre étude, les réponses de défenses de la vigne contre le mildiou et l'oïdium, induites par les trois éliciteurs, conduit à une forte modulation de l'expression des gènes *ANTS*, *CHORM* ou *CHORS*. Nous suggérons, qu'à l'instar du modèle *Arabidopsis*, la vigne serait capable de moduler ses défenses et de produire des phytoalexines différentes des stilbénoides pour lutter plus efficacement contre certains agents pathogènes. Toutefois, cette voie des indoles est également celle qui préfigure la biosynthèse de l'auxine (AIA) (Figure 34) et l'implication d'un rôle du BTH sur cette voie de manière directe ou indirecte reste plausible au vu de certain effet de retard de croissance qu'induit un traitement avec le BTH (cf. partie II).

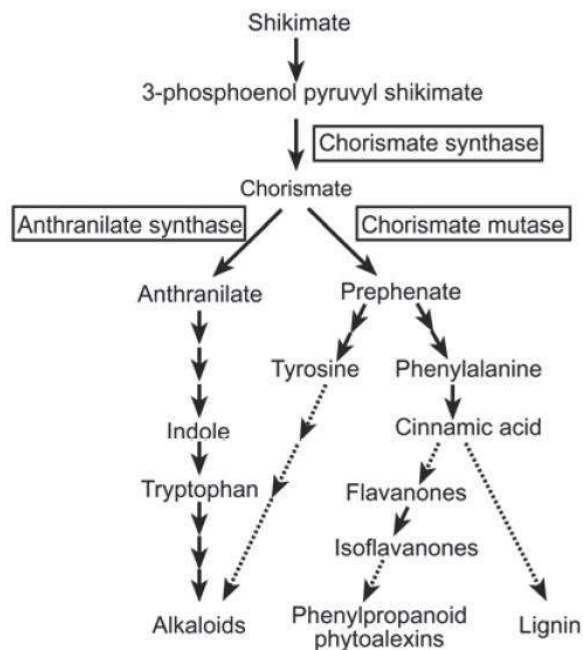


Figure 34: Voies métaboliques conduisant à la production de métabolites secondaires et des composés antimicrobiens chez l'orge (Hu *et al.*, 2009).

Outre, les phytoalexines ayant des activités antifongiques, la plante empêche le développement d'un bio-agresseur en renforçant ses parois pectocellulosique par dépôt de lignine ou de callose qui serviront de barrière mécaniques, affectant ainsi l'efficacité de pénétration de l'agent pathogène. L'exploration de ces nouvelles voies métaboliques a donc été entreprise, en dessinant de nouvelles amorces spécifiques de gènes codant pour d'autres gènes impliqués dans les défenses de plante.

En conclusion de cette partie, nous avons développé un système d'évaluation *in vitro* de l'efficacité de produits éliciteurs au niveau biologique, moléculaire et biochimique. Les modifications observées au niveau moléculaire et au niveau biochimique nous confirment que les mécanismes de défense de la vigne sont complexes. La méthode "BioMolChem" utilisée dans cette étude a permis d'étudier plus finement le comportement de la vigne, face à une attaque de mildiou et d'oïdium, dans ses réponses après une élicitation, et montre que la plante module son métabolisme en fonction du produit utilisé, mais également en fonction de la diversité phénotypique et génétique des agents pathogènes rencontrés.

Cette méthode devra être testée en conditions naturelles au vignoble afin d'être validée pour appréhender les limites de l'usage des SDPs au vignoble, lors de l'élaboration de stratégies de lutte alternatives ou complémentaires aux fongicides. Ce travail fait l'objet de la deuxième partie de ma thèse.

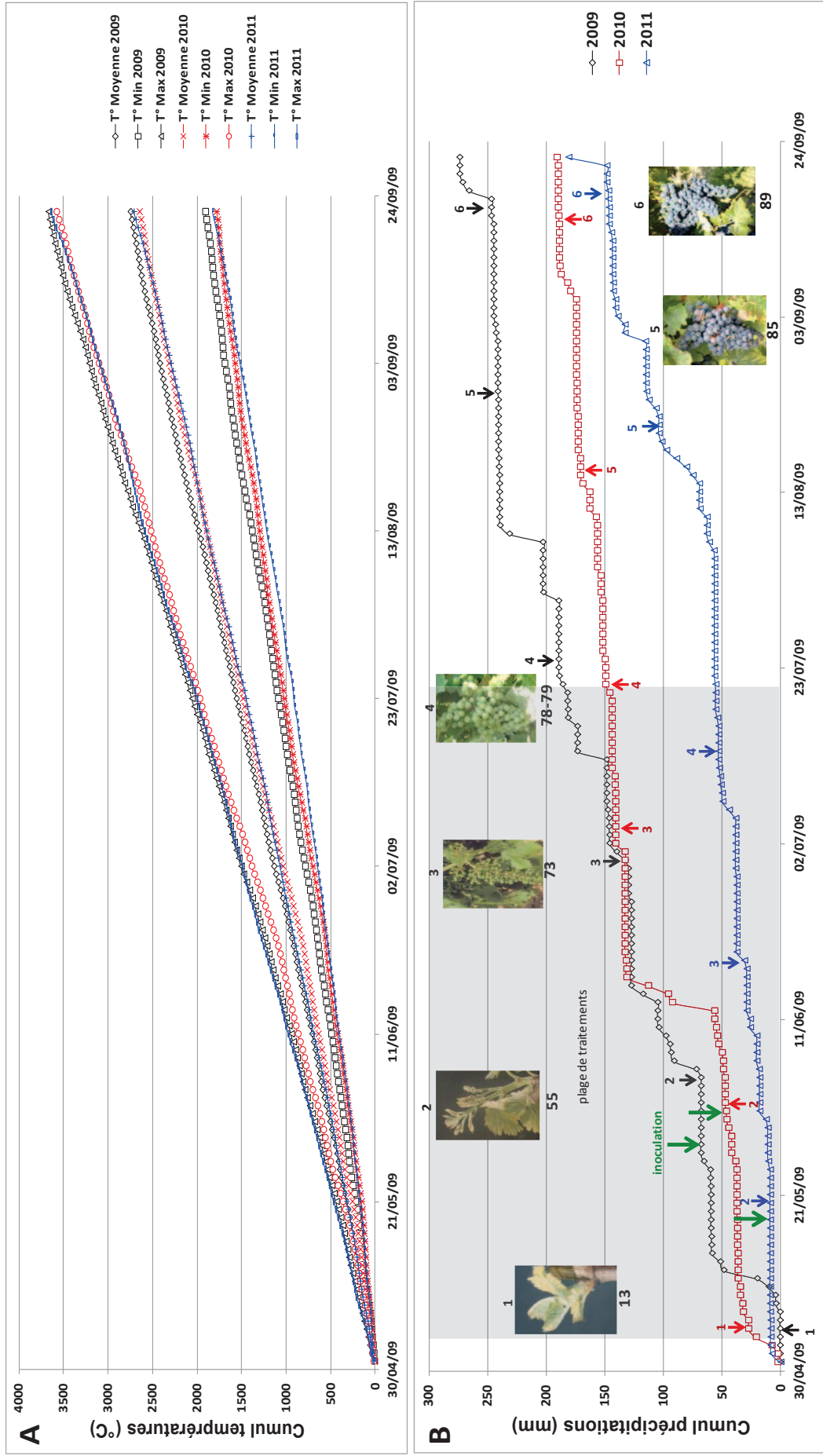


Figure 35: Données climatiques du 1^{er} mai au 25 septembre 2009, 2010 et 2011 ; (A) cumul des températures en °C et (B) cumul des précipitations en mm. Plage grisée : période de traitements.

Partie II : Evaluation, comparaison et efficacité des effets inducteurs *in natura*

1 Introduction

Des essais au vignoble, sur des parcelles expérimentales élémentaires prétraitées avec les différents produits éliciteurs (BTH, FOS), ont été réalisés en 2009, 2010 et 2011, afin d'évaluer l'efficacité de ce type de méthode en conditions naturelles. Les travaux réalisés se sont attachés à répondre à 3 questions majeures :

- Peut-on appliquer cette méthode et l'intégrer dans les stratégies de lutte avec des résultats intéressants ?
- Peut-on évaluer l'état de défense de la vigne *in natura* et valider les marqueurs développés précédemment ?
- La triple approche "BioMolChem" peut-elle nous éclairer pour expliquer les variabilités de réponses et d'efficacité observées ?

Pour ce faire, nous avons effectué des inoculations artificielles avec les deux agents pathogènes. Le projet s'est intéressé principalement aux mécanismes de défense de la vigne, de la période du débourrement (fin avril- début mai), à la véraison (juillet). Au cours de chaque essai, l'efficacité a été évaluée par :

- un suivi des épidémies et des mesures de rendement,
- l'expression de gènes de défense,
- des analyses qualitative et quantitative par HPLC des composés phénoliques présents dans des feuilles prélevées à différents temps.

Le gène codant pour la chaîne gamma du facteur d'élongation 1 (*EF1 γ*) a été choisi comme gène de référence. L'ensemble des gènes utilisés dans la partie I (Tableau 17) a été utilisé sur le terrain. L'expression a été suivie temporellement sur 4 blocs répétés (cf Matériels et Méthodes- 2.2.2.).

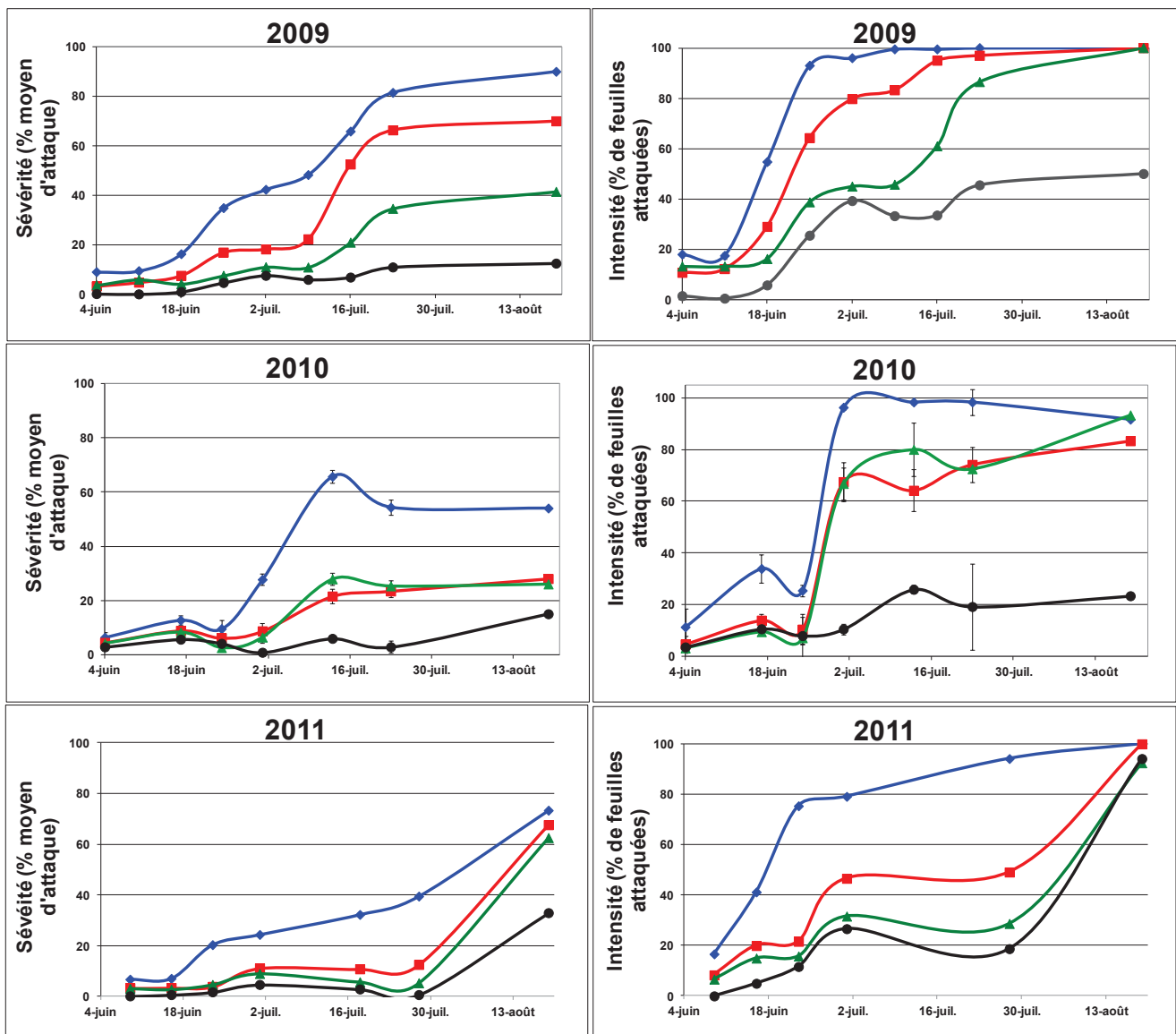


Figure 36: Evolution des épidémies de mildiou en 2009, 2010 et 2011, exprimée en termes de sévérité sur feuilles (% moyen d'attaque) et d'intensité (% de feuilles attaquées) (♦ témoin non traité ; ▲ Fosétyl ; ■ BTH et ■ Mancozèbe).

2 Résultats

2.1 Efficacité des différents traitements sur le développement des épidémies de mildiou et d'oïdium de la vigne

2.1.1 Effet des traitements sur le mildiou de la vigne

Les développements des épidémies de mildiou observées durant ces trois années d'expérimentations au vignoble ont été très différents, liés aux variations climatiques annuelles.

Le développement et la dispersion de *P. viticola* nécessite des conditions favorables de température mais surtout d'humidité car les zoospores flagellées nécessitent de l'eau liquide pour atteindre les stomates lors de l'infection. Les données climatiques recueillies montrent que globalement nous n'avons pas eu de différences en températures importantes. En revanche, de fortes différences au niveau des précipitations au cours des trois années d'expérimentation ont été observées (Figure 35).

Ainsi, l'année 2009 fût-elle la plus pluvieuse, et 2011 a-t-elle été une saison très sèche avec très peu de pluie. 2010 s'est comportée de manière intermédiaire.

En 2009, les parcelles témoins révèlent que l'épidémie prend son essor dès le 18 juin et une phase particulièrement explosive s'exprime à partir du 9 juillet, conduisant à la date du 20 août à plus de 90% de sévérité sur les feuilles. Sur grappes, plus de 90% de sévérité sont atteints en juillet (Figure 36) et aucune grappe ne subsiste à la date du 1^{er} septembre (Figure 37 et annexes 8 et 9).

En 2010, l'épidémie de mildiou est moins sévère. Elle s'intensifie comme en 2009 dès le 24 juin, puis stoppe brutalement à partir du 13 juillet, conduisant à la date du 23 juillet à seulement 54 % de sévérité sur les feuilles. Ce niveau d'attaque se maintiendra jusqu'à la fin de la saison et la récolte des fruits. Sur grappes, plus de 66% de sévérité de la maladie sont atteints en juillet sur les parcelles témoins.

Par contraste avec l'année 2009, quelques grappes sont présentes à la fin de la saison présentant un niveau d'attaque inférieur à 55 % de maladie.

En 2011, l'épidémie démarre de manière similaire à celle de l'année 2009 (18 juin), mais elle progresse doucement au cours de la saison sans phase explosive pour atteindre fin août à 68 % de sévérité sur les feuilles. Sur grappes, 40 % de sévérité de maladie est atteint fin juillet. En 2011, une deuxième inoculation artificielle a été réalisée afin d'augmenter la pression parasitaire restée trop faible à cause des conditions climatiques très défavorables au mildiou.

Au cours des trois années d'expérimentation, nous avons obtenus 3 développements d'épidémies très différents avec en 2011 des niveaux d'attaques les moins prononcés montrant un effet très important du millésime.

Le Mancozèbe, un fongicide multi-site appliqué en tant que fongicide de référence, montre une bonne efficacité tout au long de l'expérience, tant sur feuilles que sur grappes (Figures 36, 37 et 38). La sévérité d'attaque obtenue dans cette modalité est de seulement 12,5% en 2009 et 3 % en 2010 et 2011 fin juillet. Seuls 45,5 % et 20 % de feuilles sont atteintes par la maladie (Figures 36 et 38). Cependant dès l'arrêt des traitements, la maladie reprend son développement pour atteindre un peu plus de 30 % de sévérité sur feuille fin août. Malgré des intensités sur feuilles fortes en 2011, le niveau d'attaque observé sur grappes à la récolte est très faible, seulement 9 % en 2009 et moins de 4 % en 2010 et 2011 (Figure 37).

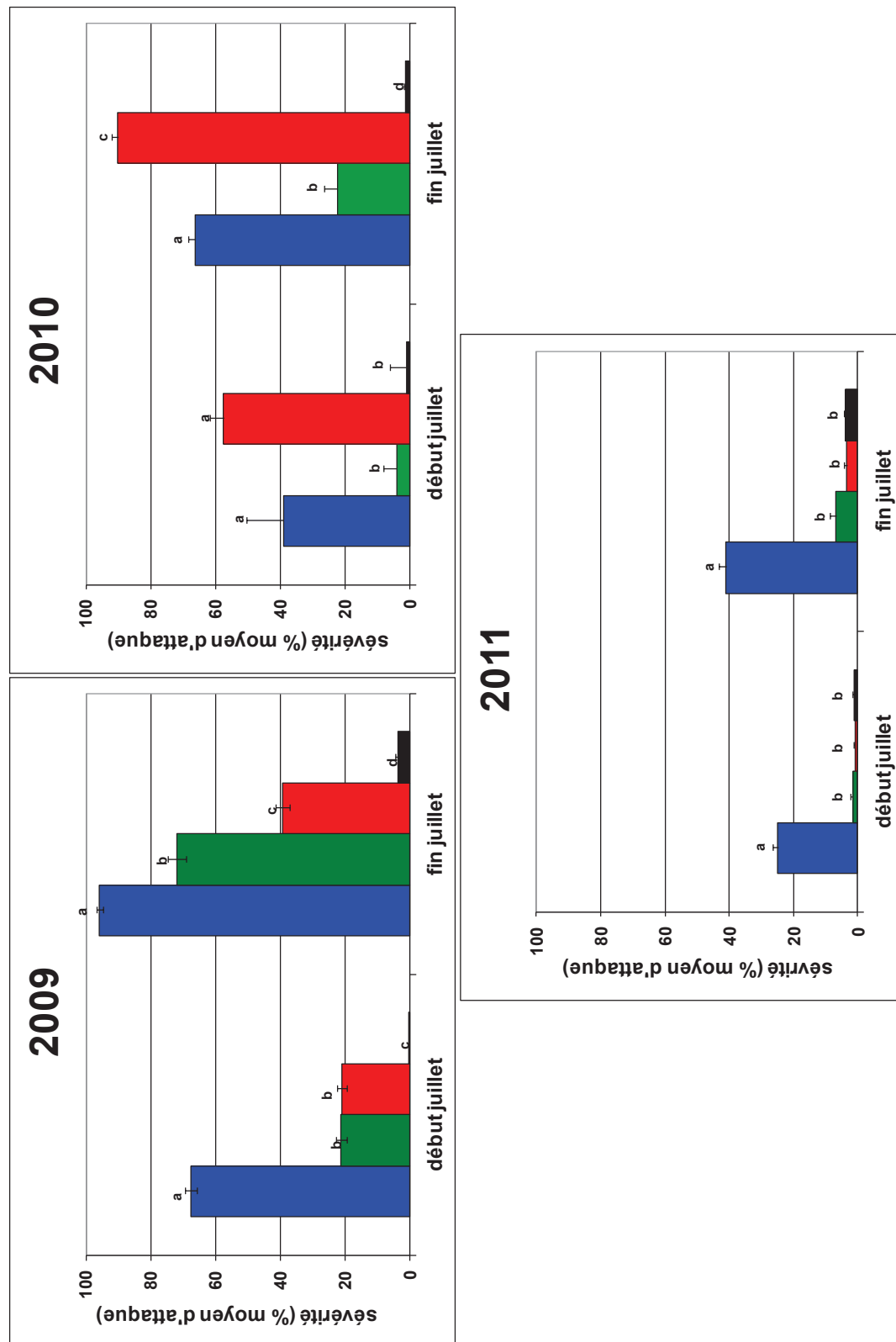


Figure 37 : Evolution des épidémies de mildiou en 2009-2010 et 2011 exprimée en sévérité d'attaque des grappes (% moyen d'attaque). (■ témoins non traités ; ■ Fosétyl ; ■ BTH et ■ Mancozèbe).

Le Mancozèbe appliqué à demi-dose (1,05 g/L) selon la cadence décrite dans les Matériels et Méthodes (§ 2.2.1.3) assure également une bonne efficacité de la protection des feuilles et des grappes, non significativement différente de celle obtenue avec le fongicide à pleine dose (2,1 g/L). Nous obtenons respectivement 7,5 et 7,3 % de sévérité d'attaque sur les feuilles en juillet 2010 et 2011. Néanmoins, une sévérité d'attaque sur feuilles plus intense est atteinte en 2011 avec 41 % de sévérité fin août et seulement 21 % en 2010. Un constat identique a été fait pour la sévérité d'attaque des grappes, une attaque plus intense en 2011 (15 % de sévérité) et seulement 2,5 % de sévérité sur grappes en 2010 (Figures 36, 38 et 40).

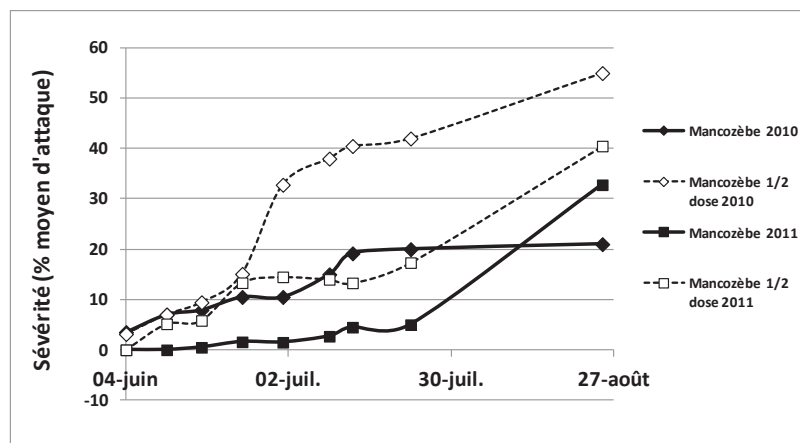


Figure 38 : Evolution des épidémies de mildiou en 2010 et 2011 en terme de sévérité d'attaque sur les feuilles avec la modalité mancozèbe à pleine (2,1 g/L) et demi-dose (1,05 g/L).

L'application de fosétyl d'aluminium (FOS) conduit à une efficacité sur feuilles qui permet de limiter à environ 40% l'attaque sur feuilles fin août (38 % en 2009, 41,5 % en 2010 et 49,4 % en 2011) (Figure 36). Sur grappes, un niveau d'attaque important est atteint en 2009, une année très favorable au développement du mildiou, avec 20% des grappes attaquées au mois de juin et 70 % en juillet. En 2010 le niveau d'attaque observé a été de 38 % en fin de saison et moins de 2 % en 2011 (Figure 37).

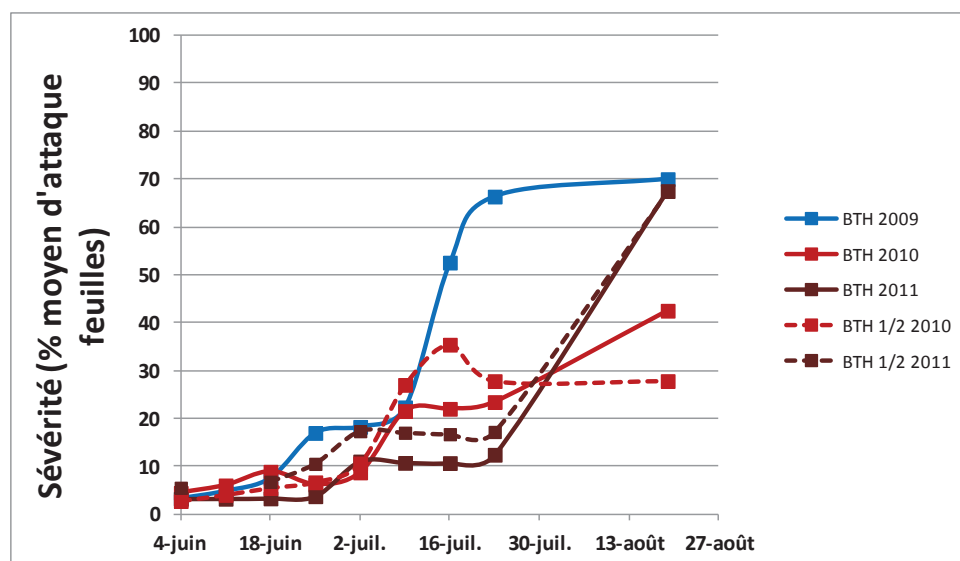


Figure 39 : Evolution épidémie de mildiou en 2009-2010 et/ou 2011 en termes de sévérité d'attaque sur feuilles avec les modalités BTH à pleine et à demi-dose.

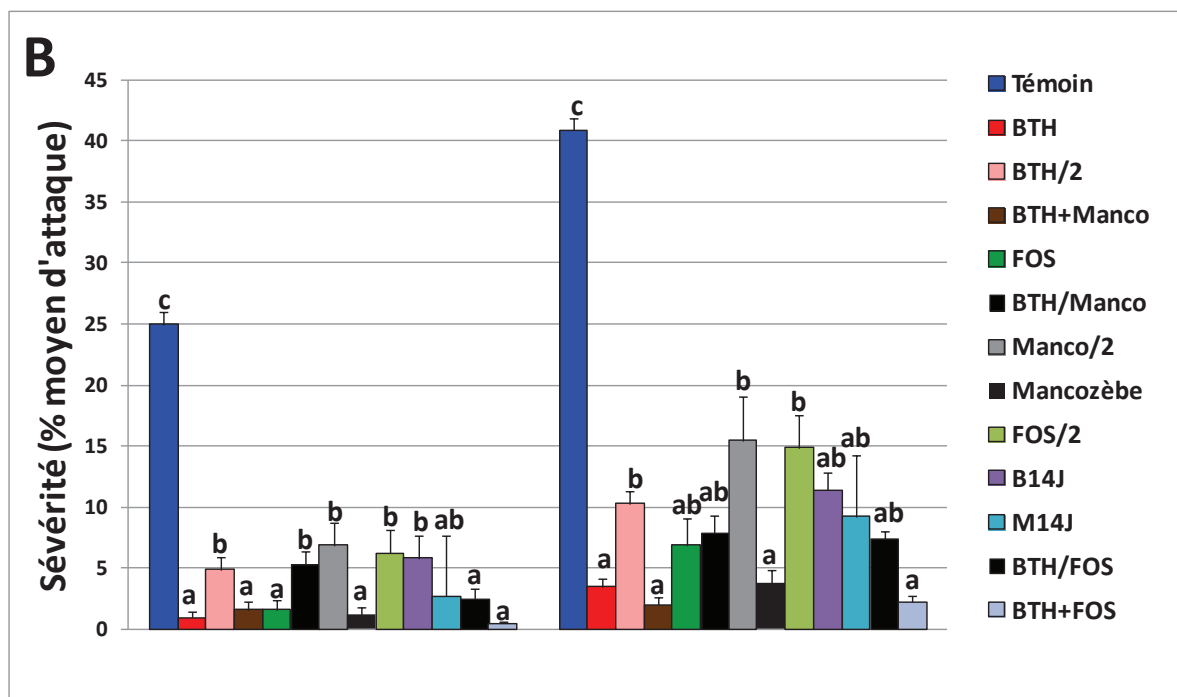
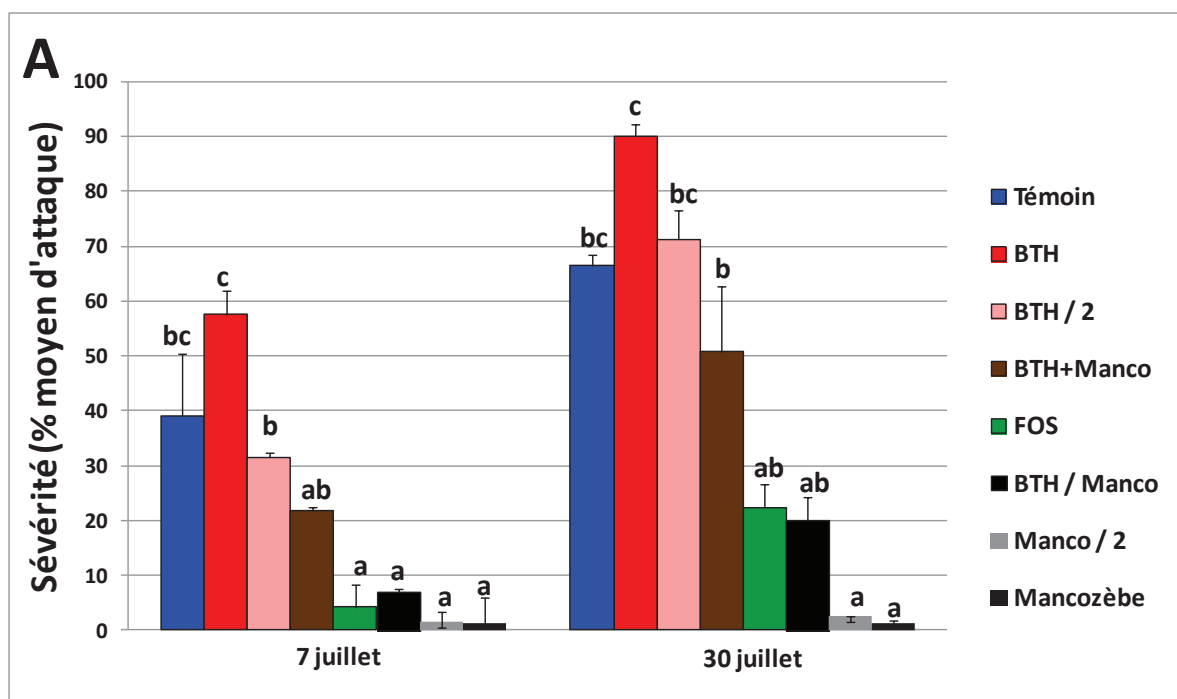


Figure 40: Sévérité d'attaque sur grappes du mildiou (A) en 2010 et (B) en 2011, exprimé en % moyen d'attaque. **BTH+Manco ou BTH+FOS** : demi-dose des produits en association, **BTH/2, Manco/2 et FOS /2** : produits appliqués à demi-dose, **BTH/Manco ou BTH/FOS** : demi-dose de produits appliqués alternativement, **B14J et M14J** : BTH et Mancozèbe à pleine dose appliqués tous les 14 jours.

Concernant le BTH, il procure une protection modérée mais significative des feuilles par rapport au témoin avec une sévérité qui atteint 70% en 2009 et 2011, et 42,5 % en 2010 (Figure 36 et 39). La protection des grappes a été plus surprenante. En effet, la sévérité atteint 90% en 2010 alors qu'elle n'est que de 40 % en 2009 et de moins de 4 % en 2011 (Figure 40). L'effet millésime et la pression épidémique semblent avoir un rôle prépondérant. À noter, que la notation de la sévérité sur grappes en 2010 a été délicate à réaliser du fait que le BTH a conduit à faire des symptômes de millerandage, qui seraient la conséquence d'un effet hormonal du BTH plutôt que de l'attaque du mildiou. En effet, au niveau foliaire, le niveau d'attaque est significativement plus faible avec le BTH que chez les témoins non traités.

En 2010, le BTH a eu un meilleur effet protecteur des feuilles qu'en 2009 et permet d'atteindre un niveau de protection similaire à celui obtenu avec le FOS (Figure 36). Suite au problème de toxicité physiologique du BTH, la protection des grappes a été meilleure avec le FOS qu'avec le BTH pour une année à pression épidémique moyenne. Des phénomènes de "russeting", qui se caractérise par une "roussissure" parfois liégeuse donnant un aspect particulier à la peau du fruit qui devient plus dure et de couleur brun verdâtre ont pu être observés (Figure 41). Cet effet physiologique est également observé après application de cuivre ou de certains fongicides. De plus, un retard de véraison a été observé sur toutes les grappes traitées au BTH au cours des trois années d'expérimentation (annexes 8, 11 et 12).

Le BTH appliqué à demi-dose révèle un niveau de protection des feuilles et des grappes similaire à celui obtenu avec la pleine dose au cours des deux saisons évaluées (Figures 39 et 40).

Lors des essais réalisés en 2010 et 2011, nous avons également comparé l'association des éliciteurs avec le fongicide de référence, soit en mélange appliqué à ½ dose chacun, soit en alternant les applications du fongicide et de l'éliciteur, également à ½ dose. Ainsi, l'association combinée du BTH et du mancozèbe à demi-dose procure une excellente protection des feuilles conduisant à une protection significativement supérieure à celle obtenue avec le fongicide seul à pleine dose en 2010 (5,8 % de sévérité au 14 septembre pour l'association contre 30 % avec le fongicide utilisé à pleine dose) (Figure 42). L'épidémie de mildiou ayant été moins sévère en 2011, l'association combinée apporte le même niveau de protection aux feuilles que le fongicide à pleine dose (Figure 42). En ce qui concerne la protection des grappes, nous observons une diminution de l'efficacité de l'association BTH+Mancozèbe comparée à celle du fongicide seul pleine dose, mais nous obtenons le même niveau de protection fin juillet 2011 avec les modalités complémentaires associant le BTH et le fongicide à demi-dose (BTH+Dithane ou BTH+ Fosétyl), qu'en présence du fongicide ou du BTH à pleine dose (entre 2 et 3,7 % de sévérité d'attaque des grappes) (Figure 40). En revanche, les modalités alternatives associant le BTH et les fongicides à demi-dose (BTH/Dithane et BTH/FOS), les produits appliqués à demi dose (BTH/2, FOS/2, Dithane/2) ainsi que les produits appliqués à pleine dose toutes les deux semaines (B14J et D14J) confèrent un même niveau de protection comprise entre 9 et 15 % de sévérité d'attaque des grappes (Figure 40).

L'alternance de demi-doses de BTH et de Mancozèbe confère une moins bonne protection en 2010 que le mélange et permet d'atteindre seulement 7,3% d'attaque sur les feuilles à la date du 14 septembre (Figure 42). En juillet 2011, la protection apportée par l'association de demi-dose de BTH et mancozèbe est similaire à celle observée en 2010 (14 % de sévérité sur feuilles). Toutefois, dès l'arrêt des traitements, la maladie reprend sa progression conduisant à 40 % de dégâts sur feuilles fin août 2011, non significativement différente à la modalité témoin (Figure 42). Sur grappes, 20 % des grappes sont attaquées fin juillet 2010 et moins de 8 % en 2011 apportant une protection similaire à celle la modalité fongicide pleine dose ou ½ dose (Figure 40).



Figure 41: "russeting" sur grappes traitées au BTH.

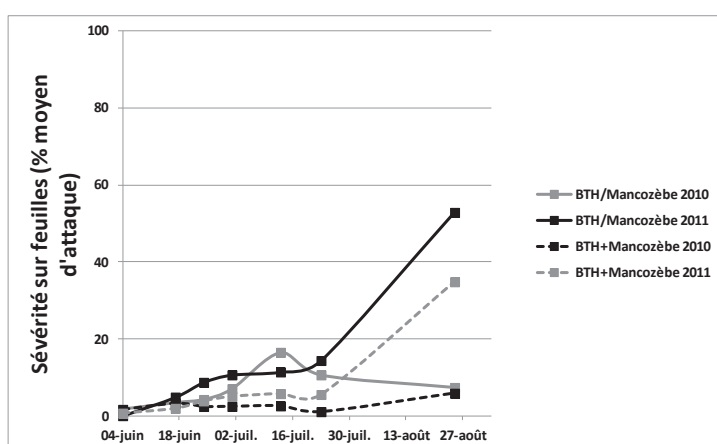


Figure 42 : Sévérité d'attaque sur feuilles de *P. viticola* en 2010 et 2011, exprimée en % moyen d'attaque avec l'association des éliciteurs avec le fongicide de référence, soit en mélange appliqué à $\frac{1}{2}$ dose chacun, soit en alternant les applications du fongicide et de l'éliciteur. **BTH+Manco** : demi-dose de produits en association ; **BTH/Manco** : demi-dose de produits appliqués alternativement.

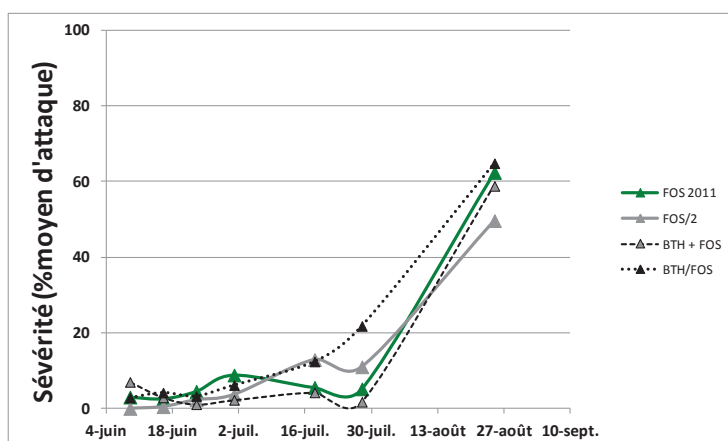


Figure 43 : Sévérité d'attaque sur feuilles de *P. viticola* en 2011, exprimée en % moyen d'attaque avec les modalités contenant du FOS à demi-dose par rapport à la pleine dose. **FOS/2** : FOS appliqué à demi-dose tous les 7 jours ; **BTH+FOS** : demi-dose de produits en association appliqués tous les 7 jours ; **BTH/FOS** : demi-dose de produits appliqués alternativement tous les 7 jours.

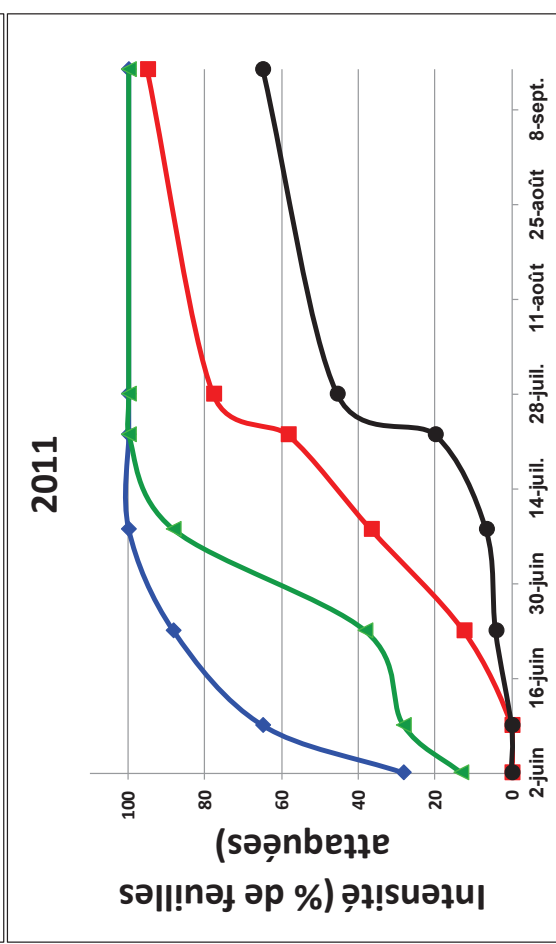
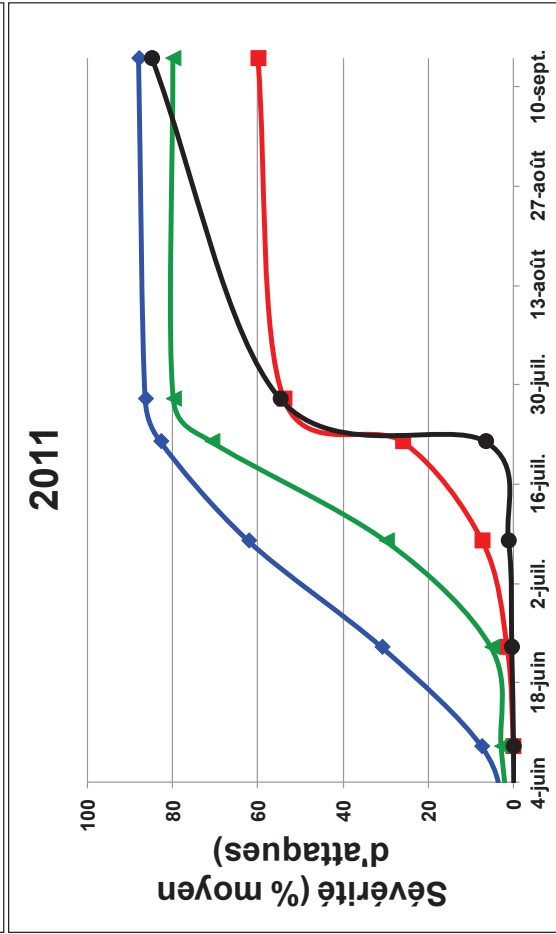
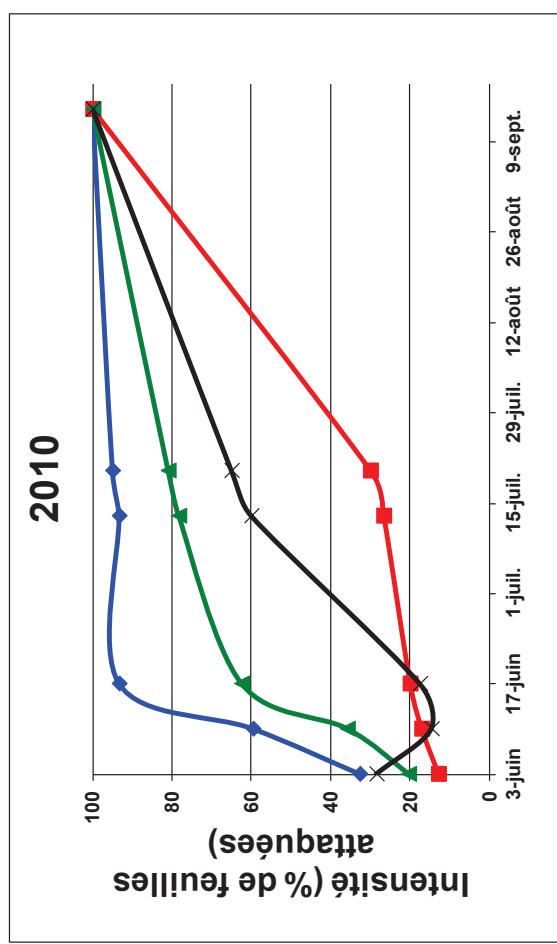
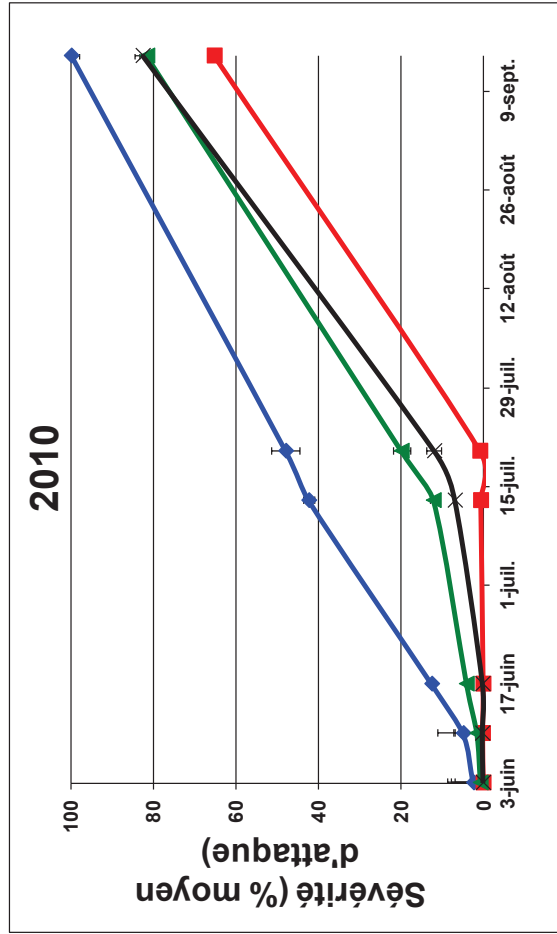


Figure 44 : Sévérité et intensité d'attaque sur feuilles de *E. necator* en 2010 et 2011, exprimées en % moyen d'attaque et % de feuilles attaquées, respectivement (◆ modalité témoin non traitée ; ● modalité témoin traitée au Tébuconazole ; ■ traitée au BTH et ▲ traitée au fosetyl).

Concernant le phosphonate, en l'occurrence le fosétyl-Al, la demi-dose procure une protection identique des feuilles (4,2 % de sévérité d'attaque) à celle obtenue avec le fosétyl pleine dose (Figure 43). Utilisé en association ou en alternance avec le BTH, le niveau de protection atteint est intermédiaire à celui du FOS pleine dose et des témoins non traités, avec une sévérité d'attaque des feuilles fin juillet de 12,9 % et 14,3 %, respectivement (Figure 43). Au niveau des grappes, nous obtenons la même protection fin juillet 2011 avec les modalités associant le BTH et les fongicides à demi-dose (BTH+Mancozèbe ou BTH + FOS) qu'avec les fongicides ou le BTH à pleine dose (entre 2 % et 3,7 % de sévérité d'attaque des grappes) (Figure 40). Toutefois, les modalités alternant le BTH et FOS révèlent une efficacité sur grappe fin juillet 2011 inférieure aux modalités les associant. L'alternance semble procurer une protection intermédiaire à celles des produits seuls à ½ dose et à celle de l'association.

De façon générale, nous obtenons un meilleur niveau de protection des feuilles avec une association BTH et fongicide qu'avec une utilisation des produits en alternance. Les résultats obtenus en 2010 et 2011 sur grappes sont contradictoires. En effet, nous obtenons des résultats opposés : une meilleure protection est apportée avec l'association BTH-Mancozèbe en 2011 qu'avec l'alternance, et des résultats opposés sont obtenus en 2010. Nous suggérons dans ce cas, qu'en 2010, année où des effets importants du BTH sur la physiologie de la vigne ont été observés, lors des notations, la perte de grain, lié à du millerandage du au BTH ait été imputé à un effet mildiou. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'année 2010, la pression parasitaire du mildiou était la plus faible sur les trois années d'expérimentation.

2.1.2 Effet des traitements sur l'oïdium de la vigne

Les essais oïdium ont été réalisés en 2010 et 2011 et les épidémies issues des inoculations artificielles ont conduit sur les parcelles témoins à des résultats assez proches. En effet, nous notons une forte progression quasi linéaire, dès le début juin qui évolue au cours de la saison et conduit vers mi- septembre, de 90 à 100% de sévérité d'attaque sur les feuilles. Sur grappes, plus de 80 à 95% de sévérité d'attaque sont observés mi-septembre (Figures 44 et 45 et annexes 13 et 15).

Le fongicide de référence choisi, le Tébuconazole est un triazole inhibant la biosynthèse des stérols, en particulier la C14-déméthylase d'*E. necator*. En 2010, la protection assurée par le fongicide s'est avérée moins bonne que les traitements avec le BTH, avec une sévérité d'attaque obtenue de 12% avec 65% de feuilles attaquées, et 28,2% d'intensité sur grappes et 100% de grappes attaquées à la fin de la saison 2010 (Figure 44). En 2011, les traitements fongicides ont permis de contenir totalement la maladie malgré une épidémie plus forte qu'en 2010, avec seulement 6,5 % de sévérité d'attaque sur feuilles fin juillet. L'arrêt des traitements fongicides à cette date conduit à une explosion de la maladie qui atteint 100 % d'attaque sur feuilles à la mi- septembre (Figure 44). Suite à ce pseudo-échec de protection en 2010, nous avons évalué le niveau de résistance de l'oïdium aux DMI présent sur la parcelle en fin de saison. La présence d'allèle de résistance dans la population d'oïdium a été détectée et quantifiée d'après la méthode mise au point au laboratoire par Dufour *et al*, 2010 (annexe 16). Nous avons obtenu une fréquence allélique de 31% de la population d'oïdium en fin de saison, de l'allèle portant la mutation conférant la résistance à ce fongicide.

Le fosétyl d'aluminium connu comme anti-oomycète, a néanmoins été évalué sur les épidémies d'oïdium. Son efficacité sur les feuilles est similaire à celle du fongicide de référence en 2010 mais il présente une efficacité moindre en 2011 lors d'une pression épidémique plus forte (Figure 44). Sur grappes, la protection apportée par le FOS est significative, avec respectivement 72 et 38,4 % de dégâts sur grappes en 2010 et 2011 (Figure 45).

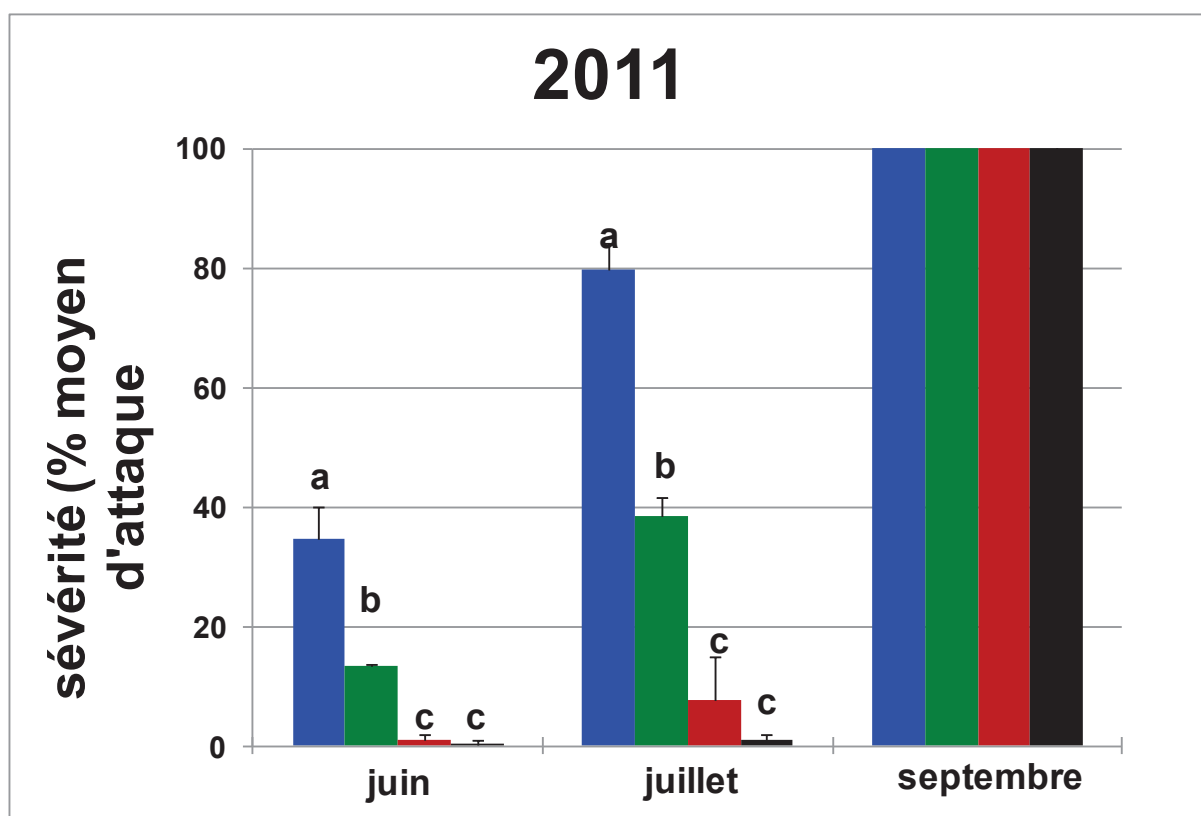
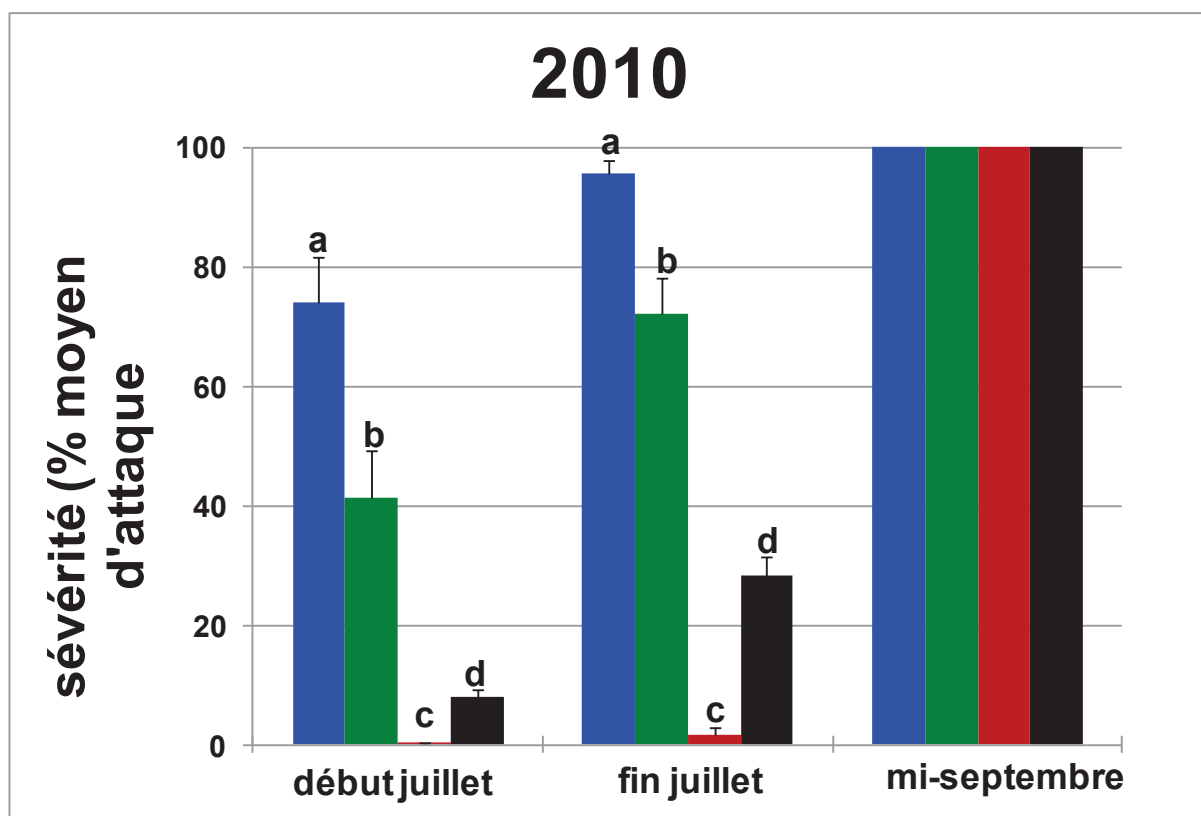


Figure 45 : Evolution de l'épidémie d'oïdium sur grappes en 2010 (A) et 2011 (B) (■ modalité témoin non traitée ; ■ modalité traitée au Tébuconazole ; ■ traitée au BTH et ■ traitée au fosétyl).

L'arrêt des traitements fin juillet conduit à une reprise foudroyante de la maladie pour atteindre une sévérité d'attaque de 60 à 100 % sur feuilles (Figure 44) et 100 % sur grappes fin septembre pour les deux années (Figure 45).

Concernant le BTH, connu pour ses effets sur l'oïdium, les résultats obtenus sur les deux années sont similaires. Le traitement procure une très bonne protection pendant toute la durée des traitements (jusqu'à fin juillet). L'efficacité des traitements avec le BTH est similaire à celle apportée par le fongicide de référence (près de 1% en 2010 et 7,6 % en 2011), mais dès l'arrêt des traitements, la maladie progresse pour atteindre 65 et 95% mi-septembre respectivement (Figure 44). Sur grappe, en 2010, une meilleure protection est conférée par le BTH que par le fongicide de référence puisqu'on atteint seulement que 1,8 % de sévérité sur grappe contre 28,2% avec le fongicide alors qu'elle est similaire au fongicide en 2011.

2.2. Efficacité des différents traitements sur le rendement et la qualité des récoltes

La totalité des grappes de chaque bloc expérimental est récoltée, comptée et pesée. Nous avons ainsi évalué le rendement par le nombre moyen de grappes produites par cep et le poids moyen des grappes. Cent baies aléatoirement prélevées par modalité, sont pesées pour donner le poids moyen d'une baie. Trois lots de 3 grappes par modalité sont écrasés pour obtenir du jus de raisin et le pH est mesuré ainsi que l'acidité. Le taux de sucre du moût est également mesuré et exprimé en degré Brix (un degré Brix représente 1% en poids de saccharose dans la solution).

2.2.1. Rendement des essais

2.2.1.1. Rendement des essais inoculés avec *P. viticola*

L'année 2009, qui a subi la plus forte attaque de mildiou, a produit très peu de raisins, toutes modalités confondues (559,4 g/cep) (Tableau 20). Par contraste, l'année 2011, une année à faible incidence de maladie en a produit 3 fois plus (1564,3 g/cep), avec l'année 2010 se situant à l'interface (niveau attaque et poids récolté). A noter que le nombre moyen de grappes produites par cep n'est pas significativement différent au cours des trois années (Figure 46, Tableau 20). En 2011, les ceps ont produit de plus grosses grappes que les autres années, qui contenaient significativement un plus grand nombre de baies (3 à 6 fois plus qu'en 2010 et 2009), et significativement plus grosses (26 à 30 % plus grosses qu'en 2010 et 2009) (Tableau 20 et Figure 46).

Ces observations traduisent de manière cohérente la nuisibilité des épidémies de mildiou au cours des ces trois années.

Tableau 20: Récolte moyenne annuelle de 2009, 2010 et 2011.

	2009		2010		2011	
poids récolté par cep (g)	559.4 ± 401.1	a	1366.6 ± 422.5	ab	1564.3 ± 191.8	b
Nombre grappes par cep	13.1 ± 2.4	a	18.2 ± 2.4	a	17.1 ± 1.3	a
poids moyen grappes (g)	31.8 ± 19.2	a	68.3 ± 15.3	a	254.2 ± 7.3	b
poids (g) de 100 baies	97.2 ± 6.4	a	102.0 ± 4.8	a	126.3 ± 7.4	b
nombre de baies par grappe	32.7 ± 33.0	a	67.0 ± 31.5	a	201.3 ± 100.6	b

La modalité témoin produit significativement moins de raisins que les modalités traitées au cours des trois années. Les récoltes obtenues sur les ceps non traités nous permettent

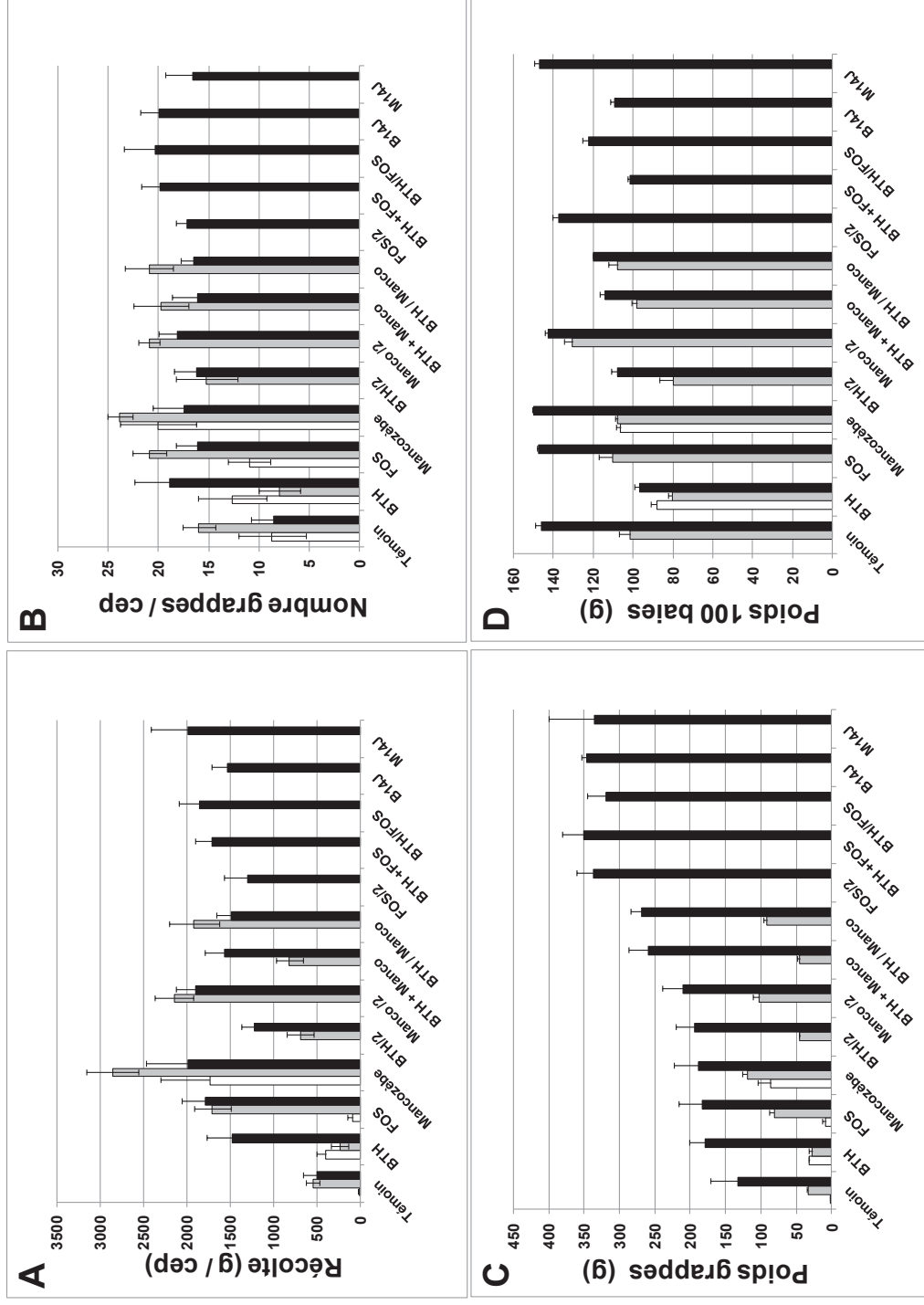


Figure 46: rendement aux récoltes 2009-2010 et 2011 : (A) poids moyen des grappes récoltées par cep et (B) nombre moyen des grappes récoltées par cep (C) poids moyen des grappes et (D) poids moyen de 100 baies (□ : 2009 ; ■ : 2011). **BTH+Manco ou BTH+FOS :** demi-dose de produits en association appliqués hebdomadairement, **BTH/2, Manco/2 et FOS /2 :** produits appliqués à demi-dose hebdomadairement, **BTH/Manco ou BTH/FOS :** demi-dose de produits appliqués alternativement hebdomadairement, **B14J et M14J :** BTH et Mancozèbe à pleine dose appliqués bi-hebdomadairement.

d'évaluer l'incidence de la maladie (année plus ou moins favorable au développement du mildiou (Figure 46 et Tableaux 20 et 21). Ainsi l'année 2009 fût très propice au mildiou et la récolte a subit une perte de 99.1 %. Les années 2010 et 2011 ont enregistré des pertes de récolte moindre mais conduisant respectivement à 80,8 et 75,1 % de perte, confirmant que l'année 2011 était moins propice à une épidémie de mildiou (Tableaux 20, 21, 22 et 23).

Quelle que soit l'année considérée, l'application de Mancozèbe à pleine dose permet d'obtenir un récolte homogène (2197 ± 339 g par cep) (Tableau 21), indépendamment des conditions climatiques, favorables ou non au développement de la maladie. L'application hebdomadaire à demi-dose ou toutes les deux semaines à pleine dose permet d'obtenir un rendement similaire de l'ordre de 2023 ± 124 et 1987 ± 428 g par cep (Tableau 21).

L'efficacité du BTH sur les trois années présente des résultats très variés. En 2009, il apporte une protection significative, puisqu'on enregistre le deuxième meilleur rendement, après le traitement fongicide, avec 22,8 % du rendement obtenu avec le Mancozèbe (Tableau 21). En 2010, un effet délétère du BTH est observé sur la production de raisin, puisque on obtient moins de grappes que chez la modalité témoin (Figure 46 B). L'application à demi-dose du BTH permet de réduire cet effet négatif et permet d'atteindre un rendement similaire à la modalité témoin (Tableaux 21 et 22). En revanche, en 2011, l'effet du BTH permet d'obtenir une récolte aussi importante que celle obtenue après traitement avec le Mancozèbe (perte de récolte de seulement 25,8%). Néanmoins, appliqué à demi-dose, la récolte est plus faible ($P \leq 0.05$).

L'association du BTH et du Mancozèbe à demi-dose (BTH+Manco) permet d'obtenir des rendements de récoltes similaires en 2010 et 2011 qu'avec l'application du BTH seul à demi-dose et l'alternance des demi-doses (BTH/Manco) permet quant à elle d'obtenir le même niveau de production que le fongicide à demi-dose (Tableaux 21, 22 et 23 et Figure 46). L'alternance BTH/Manco revient à diviser par 2 la dose appliquée de fongicide par rapport à la modalité Mancozèbe demi-dose (Manco/2) administrée hebdomadairement ou à la modalité associant le BTH et le Mancozèbe appliqués à demi-dose (BTH+Manco). Dans ce cas, il semble que l'alternance des deux produits à demi-dose soit plus intéressante que le mélange, mais cela reste à confirmer. L'association du BTH et du Mancozèbe appliqués à demi-dose provoque une perte de récolte moins importante en 2011 (21,5%) qu'en 2010 (71,4 %) alors que l'alternance des produits à demi-doses conduit à un rendement stable et induit une perte de récolte respectivement de 32,9 et 25,4 %.

Les essais réalisés avec le FOS permettent d'obtenir des rendements de récoltes proche du Mancozèbe en 2011 (90 %) (Tableau 22). En revanche, en 2009, une perte considérable de la récolte est observée quasi-totale, similaire à celle observée sur les parcelles témoins. Une diminution significative de la production de raisin est observée sur les ceps traités avec le FOS à demi-dose en 2011, dose partiellement efficace pour limiter l'épidémie de mildiou. L'association ou l'alternance des demi-doses de FOS et de BTH (BTH+FOS ou BTH/FOS) protègent les raisins de façon similaire à celle observée après traitement avec le Mancozèbe pleine dose sur la seule année testée (2011), et s'avère présenter un effet supérieur aux modalités BTH et FOS seuls appliqués à demi-dose (BTH/2 et FOS/2) (Tableaux 21, 22 et 23 et Figure 46). En 2011, il a été possible d'obtenir le même rendement qu'avec le fongicide en le remplaçant totalement par les deux éliciteurs. Bien que le bilan final d'application soit le même qu'avec le fongicide lors de l'association des demi-doses d'éliciteurs (environ 2 g/L de produits appliqués), la résistance induite de la vigne est suffisante pour produire la même quantité de raisins.

Tableau 21 : Poids des grappes par cep récoltées sur les différentes modalités appliquées en 2009-2010 et 2011

	2009	2010	2011	Moyenne
Témoin	15.0 ± 8.9	549.6 ± 77.0	496.7 ± 164.6	229.4 ± 155.9
BTH	396.3 ± 107.3	238.1 ± 97.5	1480.0 ± 296.1	463.8 ± 335.3
FOS	89.2 ± 66.1	1706.7 ± 209.6	1794.2 ± 262.9	773.1 ± 516.3
Mancozèbe	1737.1 ± 565.5	2860.4 ± 298.0	1994.2 ± 484.4	1491.0 ± 610.2
BTH/2		692.1 ± 155.8	1227.9 ± 145.5	691.9 ± 379.1
Manco/2		2148.3 ± 223.9	1899.6 ± 226.6	1423.9 ± 740.1
BTH+Manco		817.5 ± 158.2	1565.8 ± 228.6	847.2 ± 498.0
BTH/Manco		1920.0 ± 290.9	1488.3 ± 177.6	1233.1 ± 596.8
FOS/2			1298.3 ± 276.5	
BTH+FOS			1716.7 ± 194.0	
BTH/FOS			1852.1 ± 242.1	
B14J			1535.0 ± 183.9	
M14J			1987.1 ± 428.9	

BTH+Manco ou BTH+FOS : demi-dose de produits en association appliqués hebdomadairement, **BTH/2, Manco/2 et FOS /2** : produits appliqués à demi-dose hebdomadairement, **BTH/Manco ou BTH/FOS** : demi-dose de produits appliqués alternativement hebdomadairement, **B14J et M14J** : BTH et Mancozèbe à pleine dose appliqués bi-hebdomadairement.

Tableau 22 : Rendement du poids de grappes par cep récoltées sur les différentes modalités appliquées exprimé en % par rapport à la modalité Mancozèbe pleine dose.

	2009	2010	2011	Moyenne
Témoin	0.9 ± 0.5	19.2 ± 2.7	24.9 ± 8.3	15.0 ± 7.3
BTH	22.8 ± 6.2	8.3 ± 3.4	74.2 ± 14.8	35.1 ± 20.0
FOS	5.1 ± 3.8	59.7 ± 7.3	90.0 ± 13.2	51.6 ± 24.8
Mancozèbe	100.0 ± 32.6	100.0 ± 10.4	100.0 ± 24.3	100.0 ± 0.0
BTH/2		24.2 ± 5.4	61.6 ± 7.3	42.9 ± 15.3
Manco/2		75.1 ± 7.8	95.3 ± 11.4	85.2 ± 8.2
BTH+Manco		28.6 ± 5.5	78.5 ± 11.5	53.6 ± 20.4
BTH/Manco		67.1 ± 10.2	74.6 ± 8.9	70.9 ± 3.1
FOS/2			65.1 ± 13.9	
BTH+FOS			86.1 ± 9.7	
BTH/FOS			92.9 ± 12.1	
B14J			77.0 ± 9.2	
M14J			99.7 ± 21.5	

Tableau 23 : Rendement moyen sur les trois années.

Témoin	15.0 ± 7.3
BTH	35.1 ± 20.0
BTH/2	42.9 ± 15.3
FOS	51.6 ± 24.8
BTH+Manco	53.6 ± 20.4
FOS/2	65.1
BTH/Manco	70.9 ± 3.1
B14J	77.0
Mancozèbe/2	85.2 ± 8.2
BTH+FOS	86.1
BTH/FOS	92.9
M14J	99.7
Mancozèbe	100.0 ± 0.0

Au cours de l'année 2010, les modalités qui ont permis la production des plus belles grappes ont été traitées soit avec le Mancozèbe (à pleine ou demi-dose) soit avec le Mancozèbe en alternance avec le BTH (à demi-dose) (Figure 46 et Tableaux 21, 22 et 23). En revanche en 2011, seules les modalités utilisant le fosétyl à demi-dose (FOS/2, BTH+FOS et BTH/FOS) ou les traitements espacés de 2 semaines avec le BTH et le Mancozèbe (B14J et M14J) ont produit des fruits significativement plus gros que ceux des grappes témoins, les autres modalités étant intermédiaires (Figure 46 et Tableaux 21,22 et 23).

2.2.1.2 Rendement des essais inoculés avec *E. necator*

Globalement l'année 2011 a été plus favorable pour la production de raisins malgré une incidence de la maladie similaire à l'année 2010 (Figures 45, 46 et 47). En effet, les blocs protégés par le fongicide de référence (tébuconazole) ont produit 2400 g de raisins par cep en 2010 contre 8200 g en 2011, soit 3,5 fois plus et ont permis de récolter des grappes plus grosses et plus nombreuses en 2011.

En 2011, les blocs traités avec le BTH ont produit autant de grappes que les blocs non traités. Par contre en 2010, il a eu un effet délétère sur les récoltes avec une réduction du nombre et de la taille des grappes (Figure 47B).

Le FOS apporte une protection limitée des fruits en 2010 et 2011 puisqu'on obtient 45 à 63 % de perte de récolte par rapport au traitement tébuconazole, contre 70 à 87 % de pertes sur les blocs témoins (Figure 47A et Tableau 24). Les ceps traités avec le fosétyl-Al produisent des grappes significativement plus grosses que les ceps n'ayant subi aucun traitement au cours des années d'étude (Figure 47C).

Tableau 24 : Rendement du poids de grappes récoltées par cep sur les différentes modalités, exprimé en % par rapport à la modalité fongicide.

	2010	2011
Témoin	31.78	23.38
BTH	6.49	22.93
FOS	55.66	36.94
Tébuconazole	100.00	100.00

2.2.2. Qualité des récoltes

2.2.2.1. Récoltes des essais inoculés avec *P. viticola*

Concernant les essais mildiou en 2009, seules les grappes des modalités traitées avec le Mancozèbe et le BTH ont pu être analysées pour leur teneur en sucre, le pH et l'acidité de leur moût, les autres modalités n'ayant pas produit de récolte. Aucune différence significative n'a été obtenue entre ces deux modalités (Tableau 25).

La teneur moyenne en sucre des grappes récoltées en 2010 est de $197,5 \pm 5$ g/L avec un maximum de 204 g/L (BTH) et un minimum de 187 g/L (Mancozèbe). La teneur en sucre des grappes est inversement proportionnelle à la quantité de grappes produites (Figure 46 et Tableau 25A). Les grappes produites sur les blocs traités avec le BTH sont moins grosses mais contiennent plus de sucre que celles produites sur les blocs traités avec le Mancozèbe.

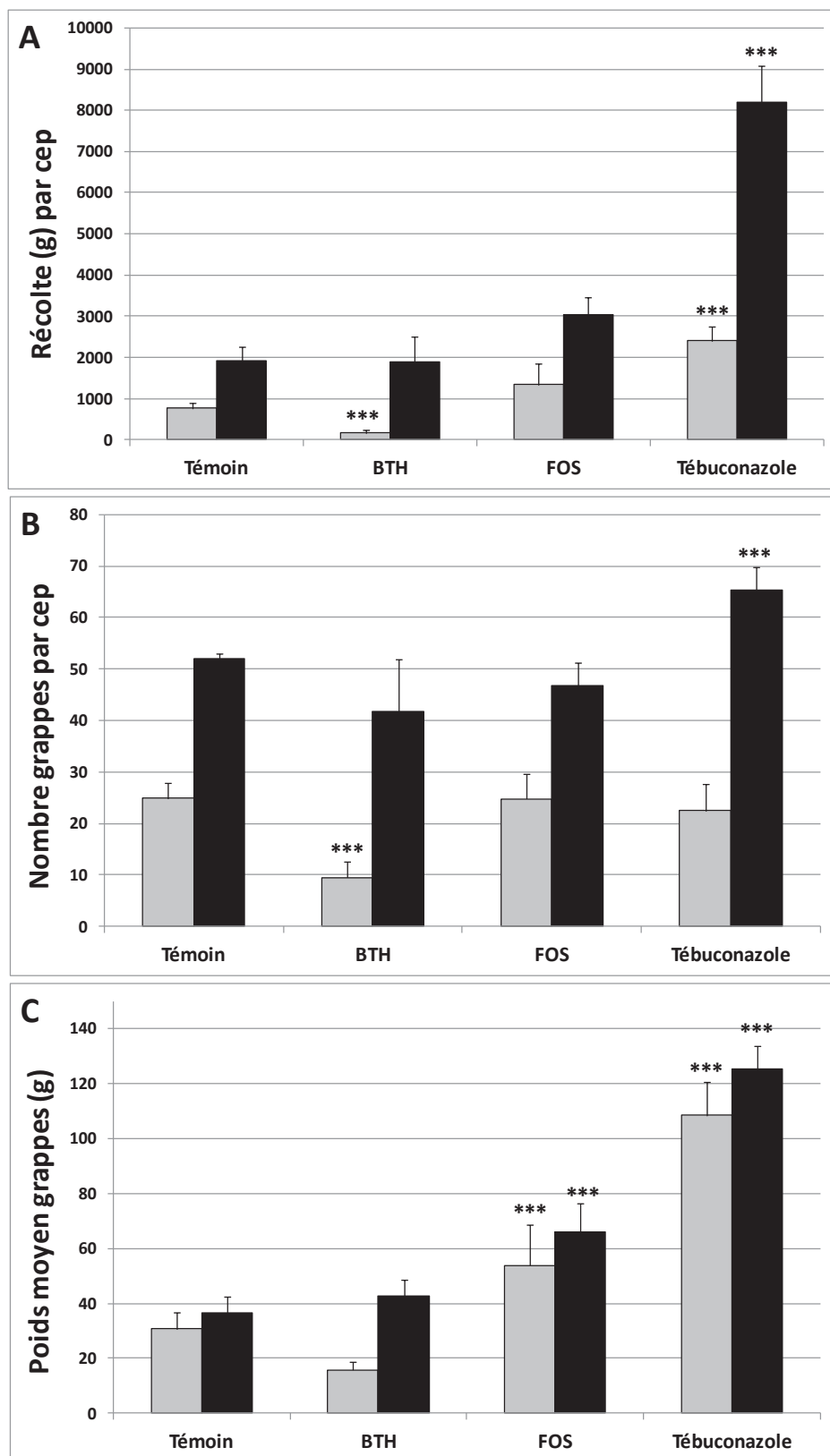


Figure 47: Rendement des récoltes obtenues en 2010 et 2011 (■ : 2010 ; ■ : 2011):
 (A) poids moyen des grappes récoltées par cep ; (B) nombre moyen des grappes récoltées par cep et (C) poids moyen des grappes.
 ***, valeurs significativement différentes du témoin au seuil 0,05 %.

Tableau 25: Evaluation de la qualité des récoltes obtenues en 2009, 2010 et 2011 par la mesure (A) de la teneur en sucre, (B) du pH et (C) de l'acidité du moût (valeurs moyenne de trois réplicats \pm écartypes).

A	Sucres (g/L)		
	2009	2010	2011
Témoins		201,10 \pm 2,60	175,83 \pm 1,27
BTH	181,23 \pm 0,17	a 204,13 \pm 2,25	ab 180,97 \pm 3,92
FOS		198,10 \pm 2,60	cde 174,90 \pm 0,35
Mancozèbe	186,20 \pm 0,17	a 187,67 \pm 7,83	ab 176,23 \pm 1,96
BTH/2		200,37 \pm 3,42	abcd 181,33 \pm 1,44
Mancozèbe /2		198,13 \pm 1,27	cde 191,53 \pm 1,19
BTH+Manco		196,63 \pm 1,33	f 185,80 \pm 0,69
BTH/Manco		194,40 \pm 3,40	ef 182,10 \pm 1,77
FOS/2			de 181,03 \pm 1,97
BTH+FOS			cde 176,87 \pm 1,34
BTH/FOS			abcd 174,00 \pm 0,64
B14J			a 175,83 \pm 1,47
M14J			abc 183,17 \pm 0,83
Moyenne annuelle	183,7 \pm 2,5	197,6 \pm 1,8	180,0 \pm 1,4

B	pH du moût		
	2009	2010	2011
Témoins		3,31 \pm 0,06	cd 3,30 \pm 0,01
BTH	3,73 \pm 0,18	a 3,39 \pm 0,10	ab 3,45 \pm 0,03
FOS		3,22 \pm 0,05	cd 3,27 \pm 0,02
Mancozèbe	3,62 \pm 1,23	a 2,96 \pm 0,10	ab 3,28 \pm 0,03
BTH/2		3,28 \pm 0,14	d 3,51 \pm 0,06
Mancozèbe /2		3,10 \pm 0,05	abcd 3,44 \pm 0,01
BTH+Manco		3,14 \pm 0,09	abcd 3,37 \pm 0,08
BTH/Manco		3,01 \pm 0,09	a 3,44 \pm 0,07
FOS/2			abcd 3,37 \pm 0,03
BTH+FOS			cd 3,46 \pm 0,03
BTH/FOS			abcd 3,34 \pm 0,05
B14J			ab 3,30 \pm 0,02
M14J			ab 3,30 \pm 0,02
Moyenne annuelle	3,7 \pm 0,06	3,2 \pm 0,05	3,4 \pm 0,02

C	Vol NaOH 0,1 M		
	2009	2010	2011
Témoins		4,40 \pm 0,66	a 4,28 \pm 0,08
BTH	4,65 \pm 0,71	a 4,65 \pm 0,15	ab 4,04 \pm 0,22
FOS		4,72 \pm 0,60	ab 4,27 \pm 0,04
Mancozèbe	4,55 \pm 0,97	a 5,47 \pm 0,25	b 4,28 \pm 0,26
BTH/2		4,17 \pm 0,45	a 3,71 \pm 0,14
Mancozèbe /2		4,64 \pm 0,19	ab 3,55 \pm 0,11
BTH+Manco		4,72 \pm 0,76	ab 4,32 \pm 0,31
BTH/Manco		5,26 \pm 0,29	b 3,73 \pm 0,59
FOS/2			ab 4,29 \pm 0,07
BTH+FOS			abc 3,94 \pm 0,10
BTH/FOS			bc 4,48 \pm 0,34
B14J			c 4,73 \pm 0,10
M14J			abc 4,22 \pm 0,02
Moyenne annuelle	4,6 \pm 0,05	4,8 \pm 0,15	4,1 \pm 0,09

BTH : 12 traitements hebdomadaires à 2 g/L et BTH/2 à 1 g/L,
 FOS : 12 traitements hebdomadaires à 2,5 g/L et FOS/2 à 1,25 g/L,
 Mancozèbe : 12 traitements hebdomadaires à 2,1 g/L et Mancozèbe /2 à 1,05 g/L,
 BTH/Manco : 12 traitements hebdomadaires de BTH à 1 g/L alternés avec Mancozèbe à 1,05 g/L,
 BTH+ Manco : 12 traitements hebdomadaires de BTH à 1g/L associé avec mancozèbe à 1,05 g/L,
 BTH/FOS : 12 traitements hebdomadaires de BTH à 1 g/L alternés avec FOS à 1,25 g/L,
 BTH+ FOS : 12 traitements hebdomadaires de BTH à 1g/L associé avec FOS à 1,25 g/L,
 B14J : 6 traitements à 2 g/L appliqués bi-hebdomadairement.
 M14J : 6 traitements à 2,1 g/L appliqués bi-hebdomadairement.

En 2011, la teneur moyenne en sucre des grappes est de 181 ± 5 g/L avec un minimum de 175 g/L (alternance de BTH et FOS à demi-dose) et un maximum de 191,5 g/L (Mancozèbe demi-dose).

Il existe un réel effet millésime, ainsi les grappes produites en 2010 sont-elles plus sucrées que celles produites en 2011 et ce qu'elle que soit la modalité appliquée. Les ceps traités avec le Mancozèbe tendent à produire des grappes moins sucrées que les autres ceps traités (Tableau 25A). En 2010, les grappes traitées avec le BTH seul appliqué à pleine ou demi-dose (BTH et BTH/2) sont significativement plus sucrées que celles traitées avec le Mancozèbe à pleine dose, mais aucune différence de la teneur en sucre n'est obtenue dans les grappes traitées des différentes modalités par rapport aux grappes non traitées (Tableau 25 A). En 2011, la teneur en sucres des grappes traitées avec des doses appliquées de fongicide réduites (Manco/2, BTH+Manco, BTH/Manco et M14J) présentent une teneur en sucre significativement supérieure à celle produites dans la modalité témoin (Tableau 25A).

L'acidité du moût reste stable quel que soit le traitement et l'année considérée, avec un pH de $3,33 \pm 0,18$ et une acidité de $4,39 \pm 0,45$ mL (de NaOH à 0,1 M). Le pH moyen des moûts obtenus en 2009 est plus élevé qu'en 2010 et 2011, est pouvait s'expliquer par une date de récolte plus précoce en 2009 (14 septembre) qu'en 2010 et 2011 (3 octobre). Pendant la maturation des fruits, la teneur en sucre augmente et le pH du moût diminue (augmentation de l'acidité également observée) (Tableau 25). Les grappes récoltées dans les modalités traitées avec le mancozèbe à pleine ou demi-dose sont significativement plus acides que celles récoltées dans la modalité témoin. (Figure 25B) et ce même en alternance avec le BTH.

2.2.2.2. Récolte des essais inoculés par *E. necator*

Les raisins produits dans ces essais étaient totalement oïdiés à la récolte en 2010 et 2011 et les analyses qualitatives des raisins n'ont pas été réalisées.

2.3. Analyses de l'expression de gènes de défense *in natura* en 2009

Pour l'étude de l'expression des gènes impliqués dans les réponses de défense de la vigne en conditions naturelles, 4 lots de trois demi-feuilles ont été extraits (§ 2.2.2 du Matériels et Méthodes et Tableaux 14 à 16 et Figures 28 et 29).

L'expression des 20 gènes, étudiés précédemment au laboratoire, a été suivie au vignoble en 2009. Ils sont généralement sous-exprimés par rapport à *EF1 γ* dans les modalités témoins, à l'exception du gène codant pour la protéine PR10, qui est 2 à 10 fois plus exprimé.

L'ensemble des résultats d'expression des gènes est exprimé par rapport à la modalité contrôle, et sont présentés sous la forme d'un gradient de couleur allant du bleu pour les gènes sous-exprimés, au rouge pour les gènes sur-exprimés (Figure 48).

A ce jour, seuls les échantillons prélevés au cours de la première année d'expérimentation ont été analysés. Dans les feuilles prélevées, 48 heures après le 3^{ème} traitement (P2, Figure 48), indépendamment du traitement, la majorité des gènes codant pour les PR- protéines sont sur exprimés (*PR1-PR10-PR2*, *PR3* et *PR8*) ainsi que les deux gènes *PAL* et *STS* codant pour deux enzymes clés de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes quelle que soit la modalité considérée. Le niveau d'expression de *PAL*, *STS* et *PR2* est totalement corrélé au niveau de protection foliaire obtenue à la fin de la saison (Figure 49 A) et celui du gène *GST* corrèle avec celui de la protection des grappes.

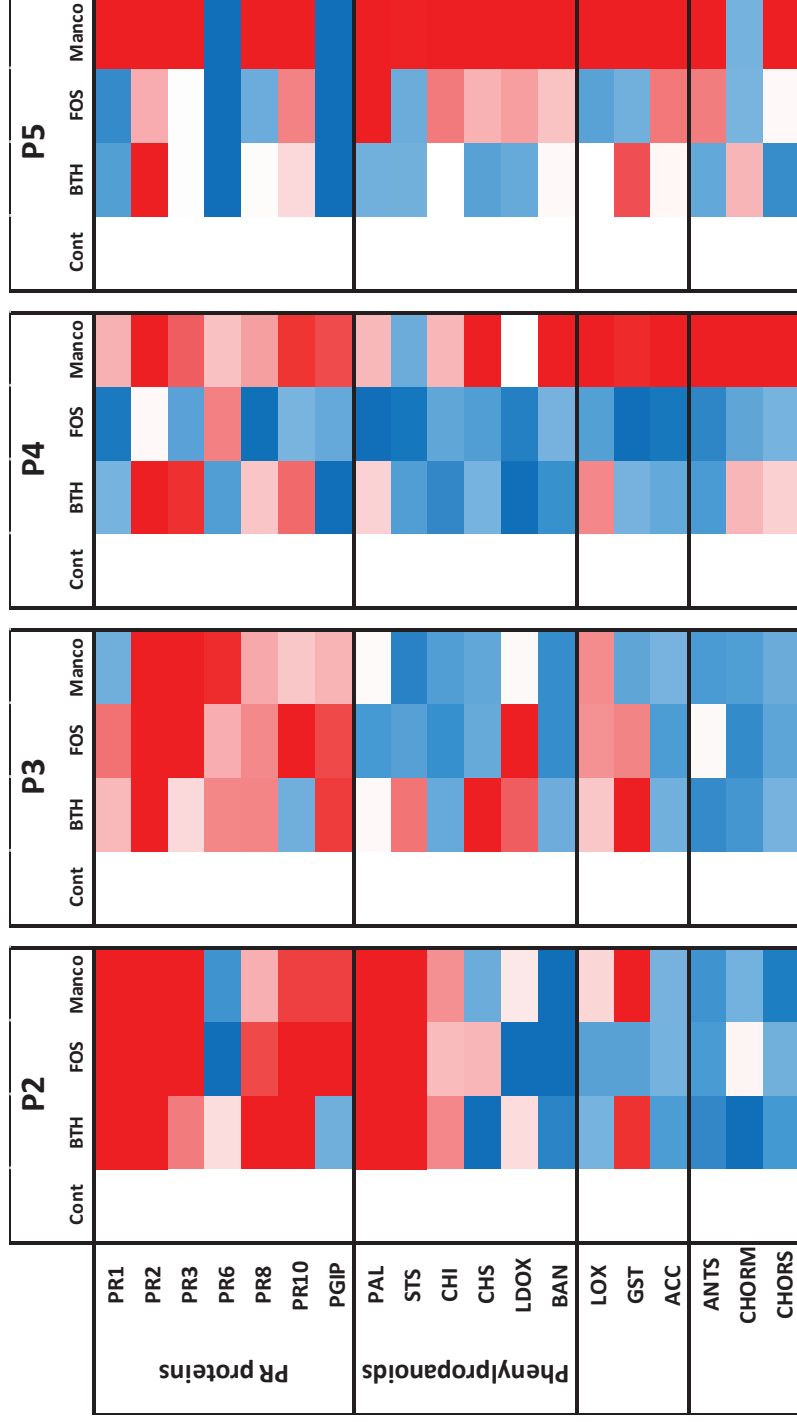


Figure 48 : Profils d'expression dans les feuilles prélevées au vignoble en 2009 des 20 gènes de défense de *V. vinifera*. Les résultats sont présentés sous la forme d'un gradient de couleur allant du rouge pour les gènes surexprimés au bleu pour les gènes réprimés, en passant par le blanc pour les gènes exprimés de façon équivalente au contrôle.

P2 : prélèvement 48 heures après le 3^{ème} traitement (20 mai) ;

P3 : 48 heures après le 4^{ème} traitement, juste avant inoculation (27 mai) ;

P4 : 48 heures après l'inoculation artificielle, après 4 traitements (29 mai) ;

P5 : 48 heures après le 8^{ème} traitement, 4 semaines après l'inoculation artificielle (24 juin).

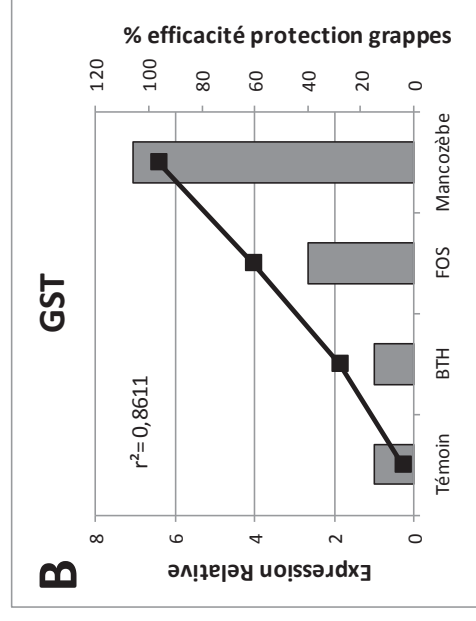
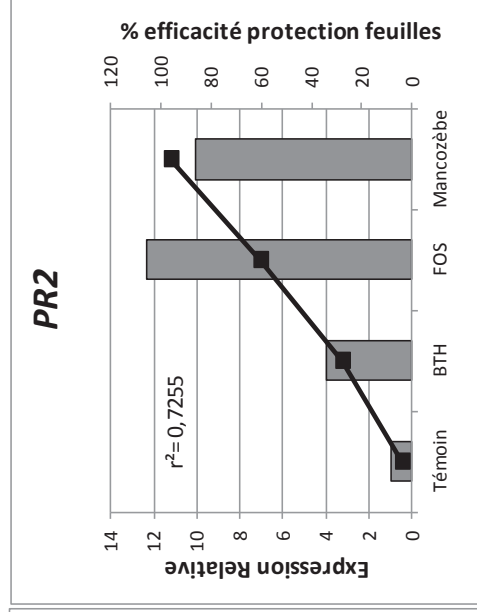
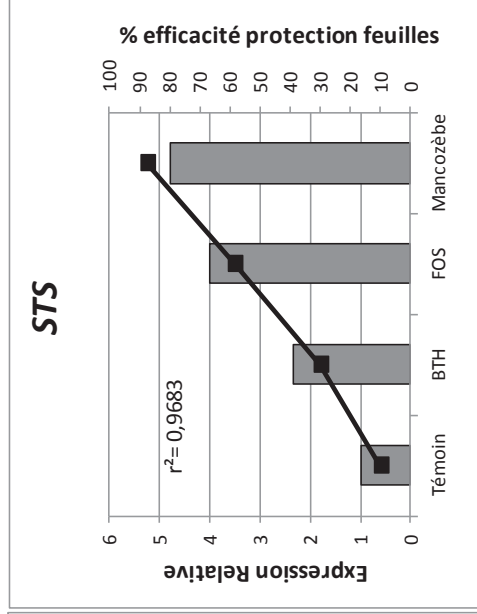
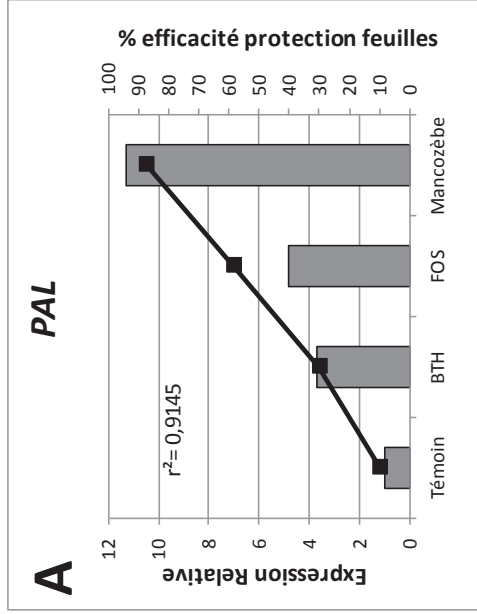


Figure 49 : (A) Corrélations entre le niveau d'expression dans les feuilles 48 heures après le 3^{ème} traitement (P2) de gènes (la phénylalanine ammoniolyase (PAL), la stilbène synthase (STS) et PR2) et le niveau de protection foliaire et (B) corrélation entre l'expression du gène de la Gluthatione-S transférase (GST) et le niveau de protection des grappes.

Globalement, même précocement, plus les gènes sont exprimés, plus les feuilles seront potentiellement protégées de la maladie (Figure 49 B).

Juste avant l'inoculation artificielle (P3), la majorité des gènes codant pour les PR-protéines sont encore sur-exprimés. Après l'inoculation (P4, Figure 48), nous observons un gradient de la surexpression des gènes, directement lié à l'efficacité des traitements, tel que les gènes *PR2*, *PR3* et *PR10* sur-exprimés dans les feuilles traitées avec le BTH et le Mancozèbe. Ainsi les feuilles provenant des blocs traités avec le Mancozèbe exhibent-elles la plus forte sur-expression de gènes (12 gènes sur 24), suivi par celles issues de la modalité BTH (4 gènes sur 24) et celles traitées avec le Fosétyl (1 gène sur les 24). Après 8 traitements (P5), (Figure 48), soit 4 semaines après l'inoculation artificielle, seules les feuilles traitées avec le fongicide présentent un haut niveau de surexpression de l'ensemble des gènes. À noter cependant une sur-expression encore visible dans les feuilles traitées avec le BTH des gènes *PR2* et de la *GST*, et du gène *PAL* dans les feuilles traitées avec FOS.

Ces résultats montrent que la surexpression des gènes codant pour une β , 1-3 glucanase (*PR2*) et des chitinases de classe III et IV (*PR3* ou *PR8*) semble étroitement liée à la protection de la vigne contre le mildiou, corroborant ainsi les résultats obtenus au laboratoire.

Ces résultats, quoique préliminaires demandent à être confortés par l'analyse des transcrits des feuilles échantillonnées en 2010 et 2011. Ainsi, les feuilles traitées avec le BTH montrent-elles une sur-expression des gènes *PR2*, *PR3* et *GST*. A noter que le gène *GST* que nous avons corrélé à une meilleure protection des grappes lors du prélèvement P2 (Figure 48) est l'un des rares gènes encore sur-exprimé à P3, P4 ou P5 dans les feuilles traitées avec le BTH et le Mancozèbe.

2.4. Analyses qualitatives et quantitatives des stilbènes *in natura*

Des analyses biochimiques réalisées par HPLC (Figure 50) montrent que parmi tous les polyphénols détectés tels que le picéide, le resvératrol, le ptérostibène ou d'autres composés inconnus, leurs accumulations ne semblent pas être totalement corrélées avec l'elicitation et/ou la protection de la vigne (Figures 51).

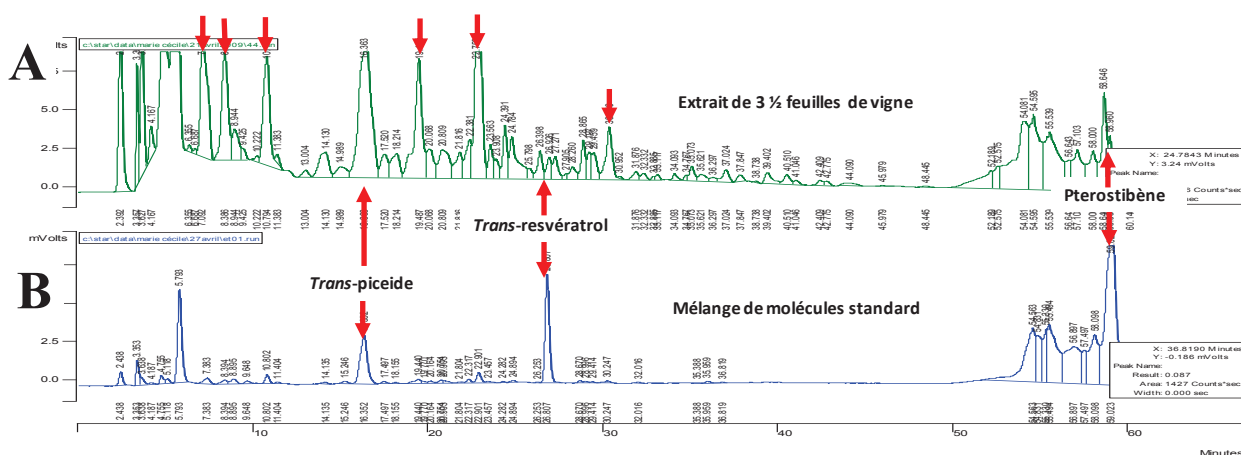


Figure 50: Profil HPLC utilisant une détection fluométrique d'un extrait de trois demi-feuilles de vigne prélevées au vignoble (A) ou d'un mélange de picéide, resvératrol et ptérostilbène de référence (B).

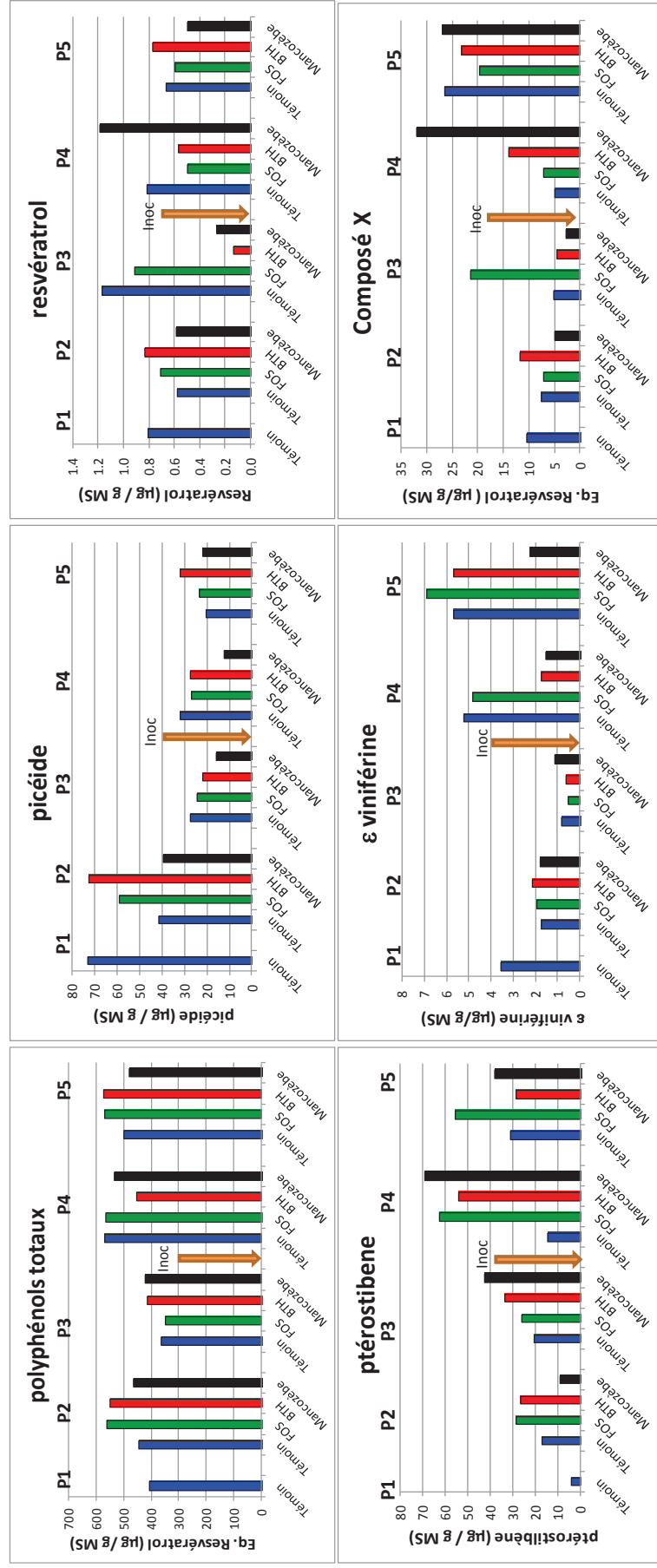


Figure 51: Analyses qualitatives en quantitatives des polyphénols, de stilbènes majeurs (picéide, resvératrol, ptérostilbènes, ε-vinitiférine) et d'une molécule inconnue (composé X) contenus dans les feuilles de vigne des différents blocs traités prélevées sur la parcelle expérimentale en 2009.

(■ : blocs témoins ; ■ : blocs traités avec le FOS ; ■ : avec le BTH et ■ : avec le Mancozèbe).

P1 : prélèvement avant le premier traitement (4 mai) ;

P2 : prélèvement 48 heures après le 3^{ème} traitement (20 mai) ;

P3 : 48 heures après le 4^{ème} traitement, juste avant inoculation (27 mai) ;

P4 : 48 heures après l'inoculation artificielle, après 4 traitements (29 mai) ;

P5 : 48 heures après le 8^{ème} traitement, 4 semaines après l'inoculation artificielle (24 juin).

Comme attendu, suite aux travaux *in vitro*, une augmentation des polyphénols totaux est observée en réponse à l'attaque de mildiou (de $3867 \pm 17,4$ à $530,9 \pm 27,4$ $\mu\text{g/g}$ de matière sèche), indépendamment du traitement appliqué (Figure 51). Les quantités de picéide et de resvératrol présents dans les feuilles après 4 traitements et avant inoculation (P3) sont inversement corrélées avec le niveau de protection des grappes (Figures 51 et 52). En revanche, les quantités de ptérostilbène sont totalement corrélées avec le niveau de protection des grappes (Figures 51 et 52). À noter toutefois une forte augmentation de 6 fois la quantité du resvératrol dans les feuilles des modalités BTH et fongicide 48 heures après l'inoculation (de 0,01 à 0,6 $\mu\text{g/g}$ de matière sèche et de 0,2 à 1,2 $\mu\text{g/g}$ de matière sèche, respectivement) Comme le picéide est une forme de stockage du resvératrol (glycosylation), lui-même précurseur du ptérostilbène (méthoxylation), les résultats obtenus au vignoble semblent corroborer les résultats obtenus au laboratoire à savoir que l'efficacité d'une partie des défenses de la vigne semble dépendre de sa capacité à mobiliser le plus rapidement possible du ptérostilbène.

Slaughter *et al.*, (2008) avait déjà souligné l'implication du ptérostilbène dans la résistance induite de la vigne contre le mildiou, après une élicitation avec le BABA et Pezet *et al.*, (2004) a montré que des cultivars résistants au mildiou réagissent rapidement en produisant au niveau du site d'infection une grande concentration de resvératrol, rapidement transformé en composés plus toxiques (ptérostilbènes et viniférines). Si nous trouvons une corrélation avec la présence de ptérostilbène, nous mettons également plutôt en évidence une corrélation négative de l'e-viniférine 48 heures après inoculation. En revanche, un composé phénolique non identifié, ayant un temps de rétention de 24,9 min semble quant à lui, positivement corrélé avec le niveau de protection et très présent en particulier dans les feuilles des modalités BTH et Mancozèbe (Figures 51 et 53).

Toutefois, ces analyses préliminaires demandent à être conforter, par l'analyse des échantillons prélevés en 2010 et 2011.

3. Conclusions et perspectives

Les expérimentations "terrains" mises en place durant ces trois années, ont permis de montrer qu'il était possible de stimuler les défenses de la vigne et de protéger partiellement celle-ci contre le mildiou et l'oïdium y compris sous de très forte pression épidémique. Il est donc plausible d'intégrer leur utilisation au sein de stratégies alternatives et/ou complémentaires afin de diminuer les intrants fongicides.

L'utilisation du Mancozèbe à demi-dose en 2010 et 2011 a protégé la vigne contre le mildiou aussi efficacement qu'à pleine dose en présence d'une pression épidémique forte à moyenne. Le BTH associé au fongicide, ou administré en alternance, a permis d'augmenter le niveau de protection obtenu avec le fongicide seul. Les résultats les plus prometteurs de 2010 et 2011 concernent les traitements BTH en alternance avec le fongicide ou en association à demi-dose. Ainsi, les doses de fongicide et de BTH ont-elles été réduites de 2 à 4 fois tout en conservant une bonne efficacité. Cependant, nous ne sommes pas dans des conditions de traitements raisonnés, avec les cadences réalisées lors de ces expériences.

Le traitement avec le fosétyl conduit à une protection anti-mildiou sur les feuilles similaires en 2010 et 2009, et peu satisfaisante en 2011 (environ 40% de sévérité sur feuilles en 2009 et 2010 et 62,5 % en 2011). En revanche, les résultats obtenus sur grappes sont très différents : les grappes produites sont significativement plus nombreuses et plus grosses en 2011 qu'en 2010 et quasi absentes en 2009.

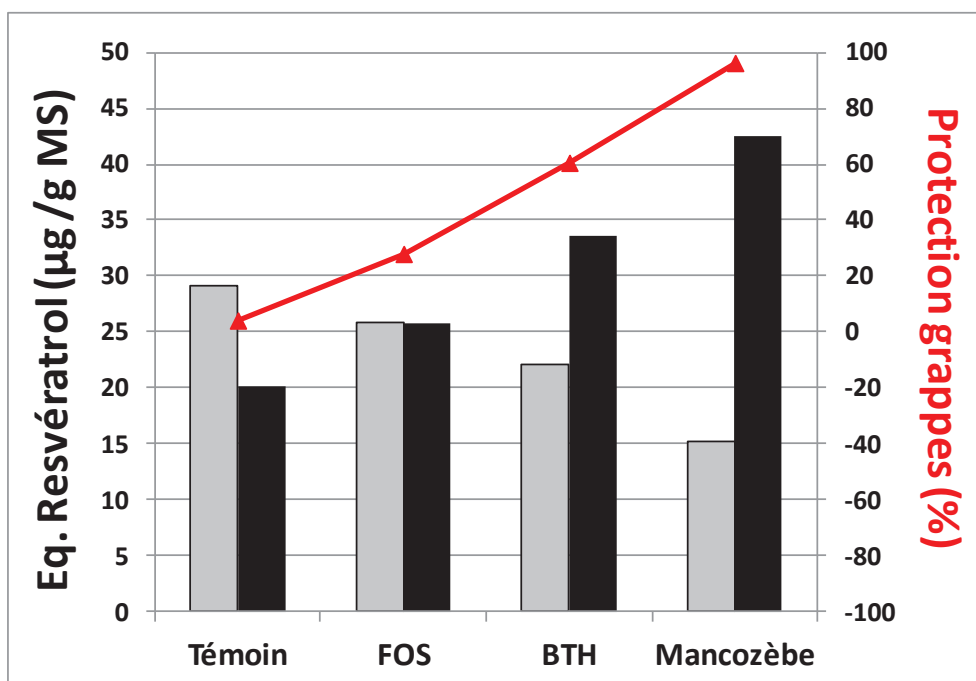


Figure 52: Quantité de Resvératrol + picéide (■) et de ptérostilbène (■) accumulés dans les feuilles de vigne après 4 traitements et avant inoculation artificielle de mildiou (P3).

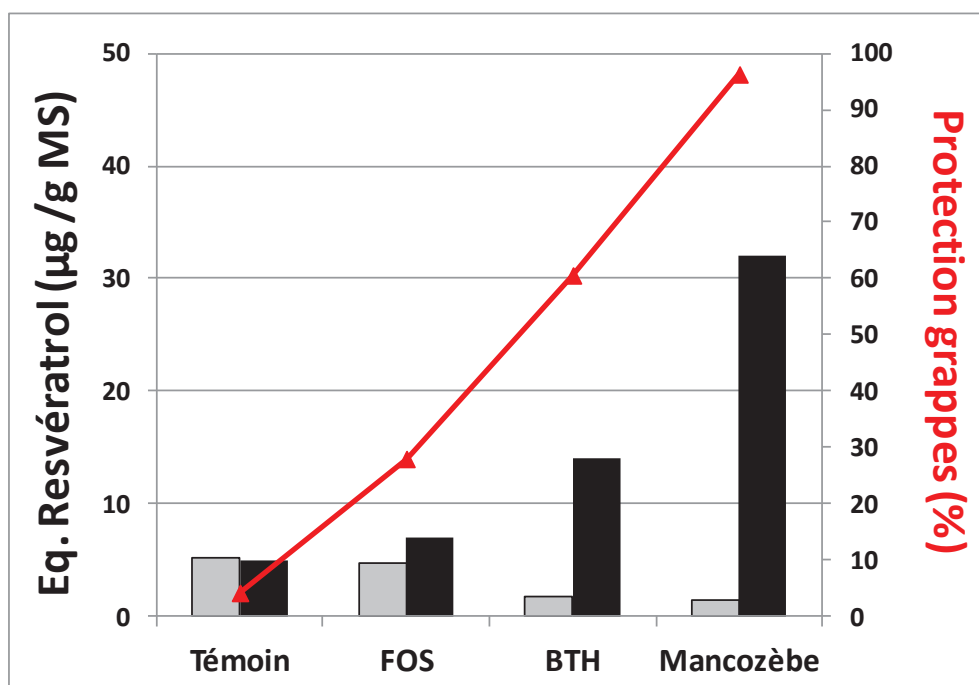


Figure 53: quantités d' ϵ viniférine (■) et d'un composé inconnu (composé X, TR = 24,9 min) (■) dans les feuilles prélevées sur le terrain, après 4 traitements et 48 heures après inoculation artificielle de mildiou (P4).

Par conséquent, une meilleure protection des fruits a été obtenue en 2011 (6,8 % de sévérité d'attaque contre 70 % en 2009 et 38% en 2010). L'efficacité protectrice du Fosétyl (anti-mildiou ou anti-oïdium) est fortement variable et semble dépendre des conditions climatiques et des pressions épidémiques.

Concernant le BTH, il semble que l'efficacité de sa stimulation dépende beaucoup de l'état physiologique de la vigne. En effet, quel que soit le millésime, il semble induire une réduction systématique du nombre des grappes et de leur taille indépendamment du taux de maladie, par rapport aux grappes traitées avec le fongicide.

La mise en place de stratégies alternatives utilisant les SDP au vignoble présente des résultats souvent décevants et inexplicables car les essais sont rarement adaptés aux questions posées. En déterminant des courbes doses-réponses pour chaque SDP en conditions contrôlées (cf. Partie I), nous avons pu choisir une dose minimale de BTH efficace à appliquer au champ très supérieure à celle utilisée par nos collègues (60 mg/L). À tel point, que Perrazolli, dès la présentation de nos résultats préliminaires en 2007 à l'ICPP de Turin a utilisé cette dose de 2 g/L (Perrazolli *et al.*, 2008). Etant donné que les expérimentations au vignoble conduisent à des efficacités bien inférieures à celles obtenues au laboratoire, nous avons choisi de traiter les blocs expérimentaux à une dose supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de 1,5 g/L soit une dose de 2g/L.

La transposition de la méthode « BioMolChem », mise au point au laboratoire, sur des essais en conditions naturelles a permis d'étudier plus finement les réponses de la feuille de vigne face au mildiou et à l'oïdium, après différents types de stimulation. Les cinétiques d'expression de gènes par q-RT-PCR et l'analyse des polyphénols impliqués dans les défenses de la vigne ont permis de corrélérer certains facteurs à une protection contre le mildiou *in natura*. Certaines sur-expressions ou accumulation de produits comme le ptérostilbène sont corrélées avec un niveau de protection induite par le traitement éliciteur. Les analyses moléculaires et biochimiques des échantillons prélevés en 2010 et 2011 sont indispensables pour mieux comprendre le comportement de la plante. En effet, il apparaît que l'utilisation des SDPs au vignoble se doit de prendre en compte les conditions environnementales fluctuantes. Leur intégration dans des stratégies restent à développer, et devront s'établir sur la base de modèles de prises de décision, faisant intervenir des indicateurs fiables (risques épidémiques, pluviométrie, phénologie de la vigne).

L'outil "BioMolChem" mis au point *in vitro* s'avère d'intérêt *in natura*. Ces premières études au vignoble révèlent grande une complexité des mécanismes mis en œuvre dans l'acquisition d'un état de défense nécessaire et suffisant. Au cours de ces trois années, malgré un protocole expérimental assez rigide en termes de traitements (fortes doses, cadences régulières), de pression parasitaire (inoculation artificielle et forte pression parasitaire), les résultats obtenus sont très variables. Ces essais montrent également que l'efficacité d'un éliciteur est fortement dépendante de la dose appliquée, des conditions climatiques plus ou moins favorables au développement de la maladie et de l'état physiologique de la plante. Pour une même dose de BTH appliquée (2 g/L), son effet est limité en 2009 face à une forte épidémie de mildiou et des conditions climatiques favorables à son développement, très bonne en 2011 face à une année moins favorable au mildiou et des conditions climatiques très sèches, ou délétère en 2010 face à une incidence moyenne et des conditions climatiques particulières avec des séquences très arides. De plus, lors de ces expérimentations, nous avons également mis en évidence une sélectivité des produits en termes d'efficacité : le BTH protège mal les feuilles alors qu'il procure une protection significative des grappes et des résultats inverses ont été observés avec le FOS qui protège mieux les feuilles que les grappes.

Les pressions parasitaires appliquées au cours de ces trois années sont extrêmes, et rarement rencontrées de façon naturelle (inoculation artificielle précoce et forte). Il a été néanmoins possible de limiter significativement le développement du mildiou et de l'oïdium. Ces conditions nous ont permis de tester "la solidité" des défenses de la vigne après stimulation en nous apportant, enfin des données globales et précieuses, si nous voulons comprendre et évaluer le statut de défense de la plante et envisager l'utilisation de SDP au vignoble.

Partie III : Impact de la diversité génétique de la vigne sur l'efficacité de stimulation des défenses de la vigne *in vitro* après élicitation avec le BTH

1. Introduction

Des génotypes, issus de l'amélioration variétale, ayant introgressé des QTLs de résistance majeur au mildiou (« Rpv1 » lié au QTL de résistance à l'oïdium « Run » et/ou « Rpv2 »), présentent des niveaux de résistance partielle face à de fortes pressions parasitaires de mildiou ou d'oïdium.

L'efficacité de la stimulation des défenses de la vigne a été évaluée sur 5 génotypes différents. Au côté d'une variété sensible de *Vitis vinifera*, cv. Cabernet-Sauvignon, 4 génotypes issus d'un croisement entre *V. vinifera* et *Muscadinia rotundifolia* ayant introgressé les QTLs de résistance cités ci-dessus ont été utilisés. Le génotype ayant introgressé le QTL Rpv1 est partiellement résistant au mildiou alors que ceux ayant introgressé le QTL Rpv2 sont totalement résistants selon le tableau ci-dessous. (Tableau 26). Le QTL Rpv1 est étroitement lié au QTL de résistance à l'oïdium (Run1).

Il était intéressant d'identifier et de comparer le comportement des différents génotypes, face à la diversité intra et inter spécifique des pathogènes, mais également d'examiner s'il est possible d'augmenter leur niveau de résistance par élicitation.

Tableau 26: Comportement attendu des différents génotypes de *Vitis* face à des infections d'*E. necator* et de *P. viticola*.

génotypes	N° clone	sensibilité aux pathogènes attendue	
		oïdium	mildiou
<i>V. vinifera</i> cv. Cabernet sauvignon (N° du clone ?)		(+++)	(+++)
<i>V. vinifera</i> x <i>M. rotundifolia</i> : phénotype sensible, "Contrôle"	7054/7056	(+++)	(+++)
Rpv1	7001/7160	(---)	(+)
Rpv2	7210	(++)	(---)
Rpv1+Rpv2	7164	(---)	(---)

La comparaison de profils d'expression de certains gènes, ainsi que les profils biochimiques mis en jeu dans les feuilles de ces génotypes, face à la diversité intra et inter spécifique des pathogènes a été réalisée en complément de la possibilité d'augmenter leur niveau de résistance par élicitation. Ainsi, l'évaluation de l'efficacité de l'élicitation a-t-elle été réalisée à trois niveaux (biologique, moléculaire et biochimique) sur 5 génotypes présentant des niveaux différents de résistance vis-à-vis des deux pathogènes considérés (Cabernet Sauvignon, génotypes sensibles du BC1, Rpv1, Rpv2 et Rpv1+Rpv2) selon le protocole expérimental décrit dans "Matériels et Méthodes, § 2.2.2" (Figure 30 page 72).

Les travaux réalisés dans cette partie s'attacheront à répondre à plusieurs questions majeures :

- La sensibilité des génotypes étudiés est-elle en accord avec celle attendue ?

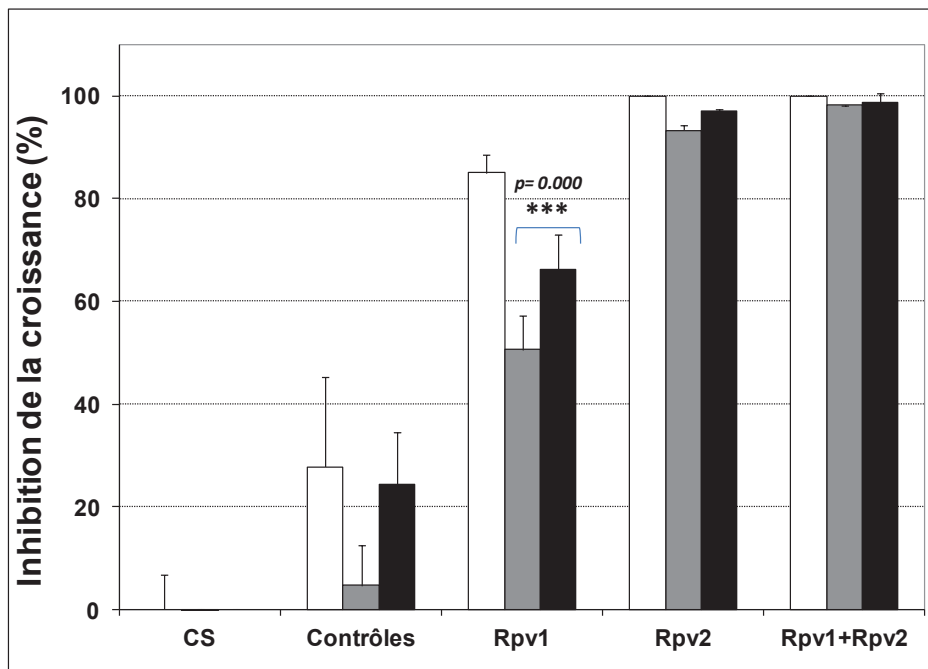


Figure 54 : Inhibition de la croissance de *P. viticola* (□) et d'*E. necator* de groupe A (■) ou de groupe B (■) sur les différents feuilles des différents génotypes.

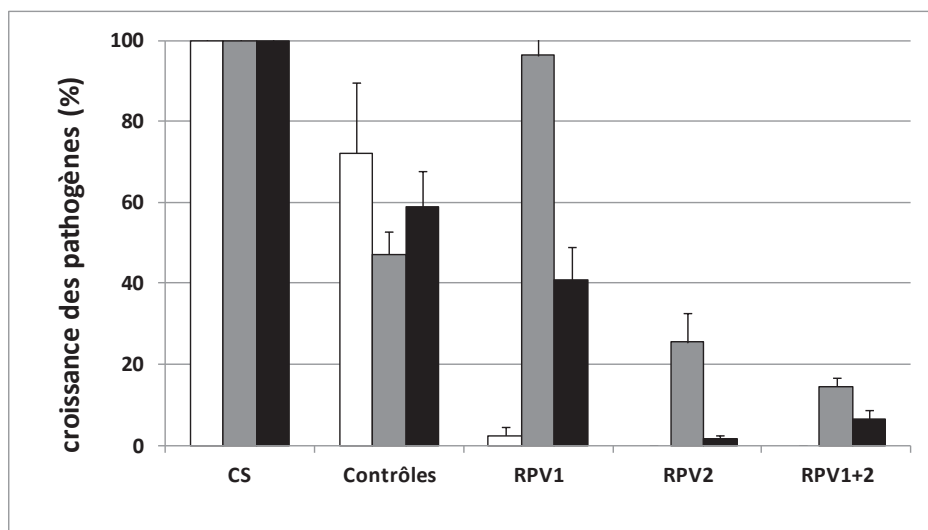


Figure 55 : Croissance d'un mélange de souches de *P. viticola* (□) et la souche LLU41 d'*E. necator* appartenant au groupe A (■) et de la souche PV74 appartenant au groupe B (■) sur les différents feuilles des différents génotypes obtenus dans le protocole expérimental spécifique pour les analyses moléculaires et biochimiques (Tableaux 11 et 12).

- Peut-on augmenter les défenses de vignes partiellement résistantes ?
- Comment réagit un génotype résistant ou partiellement résistant, face à une élicitation comparé à la réponse d'un génotype sensible ?
- La stimulation des défenses a-t-elle des limites, ou une plante peut-elle être stimulée quel que soit son niveau de défense intrinsèque ?

Le comportement de disques de feuilles de vigne pré-traitées ou non avec le BTH (0,47 et 1,90 mM) a été évalué face à une infection avec différentes souches d'oïdium appartenant aux deux groupes génétiquement distincts (8 souches du groupe A et 5 souches du groupe B) et différentes souches de mildiou présentant des caractéristiques phénotypiques différentes (9 souches présentant des résistances aux fongicides variable et des agressivités différentes).

Pour mieux comprendre le comportement de ces génotypes et les voies métaboliques mises en jeu dans les réponses de la vigne, j'ai évalué et comparé les patrons d'expression par RT-Q-PCR des 24 gènes décrits précédemment (Tableau 17 page 74) dans les réponses de défense des 5 génotypes, au niveau de feuilles témoins, élicitées par le BTH et/ou infectées par les différentes agents pathogènes.

Les génotypes du BC1 ont été fournis par l'équipe Génétique et Amélioration de la Vigne de l'UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin dirigée par Didier Merdinoglu (GAV-SVQV).

En collaboration avec le laboratoire du Prof. JM Mérillon (GESVAB-ISVV Bordeaux), des analyses qualitatives et quantitatives de stilbènes contenus dans les feuilles ont été réalisées.

2. Résultats

2.1. Caractéristiques des différents génotypes de *Vitis* utilisés

2.1.1. Comparaison et comportement des différents génotypes au niveau biologique

Les génotypes sensibles (N°7054 et 7056 du BC1 utilisés dans cette étude, sont moins sensibles au mildiou et à l'oïdium que le Cabernet-Sauvignon utilisé au laboratoire, suggérant l'expression de QTLs de résistance mineurs présents dans les génotypes "Contrôle". En effet, nous obtenons 27,8 % d'inhibition de croissance de *P. viticola*, 4,6 % et 24,3 % d'inhibition de croissance de *E. necator* de groupe A et B, (Figure 54).

Nous confirmons que les génotypes possédant le QTL Rpv1 (N°7001 et 7160) sont partiellement résistants au mildiou puisque nous obtenons une inhibition partielle de la croissance du pathogène (85 % d'inhibition, Figure 54). Nous observons également que les génotypes "Rpv1", qui possèdent également le QTL "Run1", impliqué dans une résistance complète à l'oïdium, ne conduisent pas aux résultats attendus puisque nous observons un développement d'*E. necator* (50,6 à 66,2 % d'inhibition de croissance pour les deux souches étudiées). Le génotypage des individus est basé sur des marqueurs microsatellites (SSR) fortement liés à la résistance et les marqueurs de résistance pour Rpv1 et Run1 sont identiques car ses deux QTLs co-ségrègent. Il semblerait que le QTL "Run1" ne soit pas totalement fonctionnel dans les génotypes Rpv1 étudiés. Les résultats obtenus montrent également une différence significative de sensibilité des génotypes Rpv1 face au 2 groupes d'oïdium ($P=0.000$) avec une sensibilité plus faible de ce génotype à l'oïdium de groupe A suggérant que

l'oïdium de groupe A, à priori asexué en France, et hivernant dans les bourgeons dormants, puisse s'être partiellement adapté à quelques mécanismes de défense de la vigne.

Toutefois, les génotypes possédants les QTLs Rpv2 (7210) et Rpv1+2 (7164), sont totalement résistants au mildiou comme attendu, mais permettent de légère croissance d'*E. necator* (inférieur à 10 %), correspondant à un développement mycélien partiel, non accompagné de germination de conidies.

Pour l'étude de l'expression des gènes et les analyses qualitatives et quantitatives des polyphénols, un protocole expérimental spécifique a été mis au point (cf ; Partie Matériels et Méthodes, chapitre 2.2.2.). L'évaluation de la croissance d'un mélange de souches de mildiou (Tableau 12) et de la souche *LLU41* d'*E. necator* appartenant au groupe A et de la souche *PV74* appartenant au groupe B a été mesurée sur les différents génotypes testés.

Dans cette expérience, nous obtenons des résultats différents de ceux obtenus précédemment. Bien que la croissance dans la variété sensible Cabernet-Sauvignon soit optimale, les souches d'oïdium se sont moins bien développées sur le génotype "Contrôle" (Figures 54 et 55), avec 47,2 et 58,8 % de croissance de la souche *LLU41* d'*E. necator* appartenant au groupe A et de la souche *PV74* appartenant au groupe B alors que nous avons obtenu des croissances moyennes de 95,4 et 75,7 % respectivement sur les 9 souches de groupe A et les 4 souches de groupe B. Les génotypes Rpv1 ont été plus résistants à l'attaque du mélange de souches de mildiou (2,5 % de croissance) mais plus sensibles aux attaques d'oïdium. Ainsi, la souche *LLU41* de groupe A s'est développée à 96 % et les résultats obtenus montrent également une différence significative de sensibilité des génotypes Rpv1 face au 2 groupes d'oïdium ($P=0.000$) mais cette fois-ci avec une sensibilité plus forte de ce génotype à l'oïdium de groupe B (40,8 % de croissance). Les génotypes contenant le QTL Rpv2 (Rpv2 et Rpv1+2) sont totalement résistants au mildiou mais permettent de légères croissances d'*E. necator*. Ainsi, le génotype Rpv2 permet un développement de l'oïdium de groupe A de 25 % (Figure 55).

2.1.2. Comparaison des profils d'expression des gènes des différents génotypes

L'expression des 24 gènes sélectionnés pour leur implication dans les réactions de défense de la vigne a été suivie par PCR quantitative en temps réel (RTQ-PCR) en utilisant le gène codant pour la chaîne γ du facteur d'élongation 1 comme standard interne (Tableau 17). Pour évaluer l'expression des défenses chez les différents génotypes, les patrons d'expression ont été suivis pendant trois jours. Seules les données obtenues à T0 et T24 de la première expérimentation indépendante ont été analysées à ce jour dans les feuilles des génotypes Colmar "Contrôle", Rpv1, Rpv2 et Rpv1+2 (Figures 56, 57 et 58). Arbitrairement, les gènes présentant des valeurs d'expression relative (ER) supérieures ou égales à 3 (ou inférieures ou égales à -3) seront prises en compte comme significatives.

Au cours des 24 heures (T0 et T24 confondus), la variété la plus sensible de *Vitis vinifera* cv Cabernet-Sauvignon présente plus de gènes réprimés ($N=7$), et le moins de sur-expression de gènes ($N=6$) (Figure 56). Ainsi, deux gènes codant pour des PR protéines (*PR1* et *PR8*) ainsi que les gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (*CHI*, *CHS*, *LDOX* et *F3H*) et la *LOX* sont significativement réprimés ($ER \leq -3$). A l'inverse, ceux codant pour *PR2*, *PR3*, *PR6*, l'*ACC*, la *CHORM* et la *PER* sont significativement sur-exprimés ($ER \geq 3$). Une sur-expression de *PR6*, *PAL*, *CHS*, *LDOX* et *LOX* est observée chez tous les génotypes possédant les QTLs Rpv au cours des 24 heures d'étude (Figure 57). Les génotypes possédant le QTL Rpv1 (Rpv1 et Rpv1+2) sur-expriment les gènes *ANTS* et *CHORS* au cours des 24

heures et ceux possédant le QTL Rpv2 (Rpv2 et Rpv1+2) sur-expriment les gènes codant pour *PR1*, *PR10*, *STS*, *PER* et *CAGT* (Figure 56).

Au début de l'expérimentation, lors du prélèvement des feuilles (T0), une sur-expression de *CHORM* est obtenue dans les génotypes contenant les QTLs Rpvs, une sur-expression de *PR6*, *LOX*, *ACC* et *CHORS* dans les génotypes possédant le QTL Rpv1 (Rpv1 et Rpv1+2) (Figures 56A et 58A). Une surexpression de la callose synthase (*CALS* et *LDOX*) est obtenue uniquement dans le génotype Rpv2, et une surexpression des transcrits *CHS* et *GST* uniquement dans le génotype Rpv1 et *PR3*, *PR10*, *ANR* et *ANTS* est obtenue que dans le génotype possédant les deux QTLs (Rpv1+2) (Figures 56A et 58A).

Vingt quatre heures après le prélèvement, une surexpression significative des transcrits *PR6*, *PAL*, *CHS* est observée dans les génotypes possédant les QTL Rpvs, *LDOX* et *ANTS* dans les génotypes possédant le QTL Rpv1 (Rpv1 et Rpv1+2) tandis que *PR1*, *STS*, *LOX*, *CAGT* et *PER* ne sont surexprimés que dans les génotypes possédant le QTL Rpv2 (Rpv2 et Rpv1+2). Une surexpression de *PR10* est obtenue uniquement dans le génotype Rpv2, et une surexpression de transcrit *GST* uniquement dans les génotypes Rpv1 et *CHI*, *CHORS* et *F3H* est obtenue que dans le génotype possédant les deux QTLs (Rpv1+2) (Figures 56B et 58B).

A	CS	Contrôle	Rpv1	Rpv2	Rpv1+2
	<i>PR1</i>	-7.9	1.0	-1.8	-1.1
<i>PR2</i>	-2.6	1.0	-2.6	-2.9	2.3
<i>PR3</i>	16.8	1.0	2.7	2.7	4.7
<i>PR6</i>	3.2	1.0	31.1	1.0	3.0
<i>PR8</i>	-6.6	1.0	-1.0	-5.2	-1.1
<i>PR10</i>	2.5	1.0	1.2	1.5	4.3
<i>PGIP</i>	1.2	1.0	-2.5	-1.2	2.4
<i>PAL</i>	-2.1	1.0	-3.8	1.3	1.8
<i>STS</i>	-2.3	1.0	-2.6	-2.3	-1.9
<i>CHI</i>	-4.3	1.0	-3.6	-2.1	2.3
<i>CHS</i>	1.2	1.0	3.3	-1.6	1.2
<i>LDOX</i>	-16.2	1.0	-1.2	5.2	2.1
<i>ANR</i>	-1.6	1.0	1.1	2.2	3.5
<i>F3H</i>	-15.6	1.0	-1.6	nd	1.7
<i>LOX</i>	-2.1	1.0	9.9	1.1	4.8
<i>GST</i>	-1.2	1.0	12.0	1.3	2.4
<i>ACC</i>	4.8	1.0	35.8	1.2	6.9
<i>ANTS</i>	-2.1	1.0	2.7	-1.1	6.8
<i>CHORM</i>	10.6	1.0	26.3	8.9	25.0
<i>CHORS</i>	-5.4	1.0	3.6	1.7	4.4
<i>CALS</i>	2.7	1.0	2.7	10.1	1.9
<i>PER</i>	2.3	1.0	1.8	-9.7	2.5
<i>CAGT</i>	1.4	1.0	1.2	-12.7	1.2

B	CS	Contrôle	Rpv1	Rpv2	Rpv1+2
	<i>PR1</i>	-16.2	1.0	-1.2	19.6
<i>PR2</i>	10.7	1.0	nd	nd	2.0
<i>PR3</i>	1.6	1.0	nd	-3.2	-6.6
<i>PR6</i>	1.4	1.0	3.9	12.9	28.3
<i>PR8</i>	-11.1	1.0	-3.5	-1.3	1.3
<i>PR10</i>	1.9	1.0	1.2	22.1	1.3
<i>PGIP</i>	-1.0	1.0	nd	-2.0	1.3
<i>PAL</i>	1.5	1.0	6.1	8.0	14.4
<i>STS</i>	-1.4	1.0	-2.6	7.2	7.3
<i>CHI</i>	-15.2	1.0	1.6	2.0	3.7
<i>CHS</i>	-10.8	1.0	9.6	3.5	7.8
<i>LDOX</i>	-1.2	1.0	4.1	1.7	7.6
<i>ANR</i>	-2.5	1.0	2.1	-1.0	2.9
<i>F3H</i>	-3.2	1.0	nd	2.5	7.8
<i>LOX</i>	-8.6	1.0	nd	3.0	7.9
<i>GST</i>	-1.9	1.0	32.5	2.4	1.7
<i>ACC</i>	-2.0	1.0	-1.1	1.1	1.7
<i>ANTS</i>	-2.6	1.0	25.6	2.3	6.9
<i>CHORM</i>	-1.6	1.0	1.2	-1.9	1.0
<i>CHORS</i>	-1.5	1.0	2.7	2.7	6.3
<i>CALS</i>	-2.3	1.0	1.6	-6.8	-5.0
<i>PER</i>	13.6	1.0	2.4	3.0	10.4
<i>CAGT</i>	1.3	1.0	1.7	9.7	21.2

Figure 56: Expression relative des gènes des feuilles témoin des 5 génotypes (A) lors du prélèvement des feuilles (0 hpi) et (B) et 24 heures après par rapport aux feuilles "Contrôle" non traitées et non inoculées.

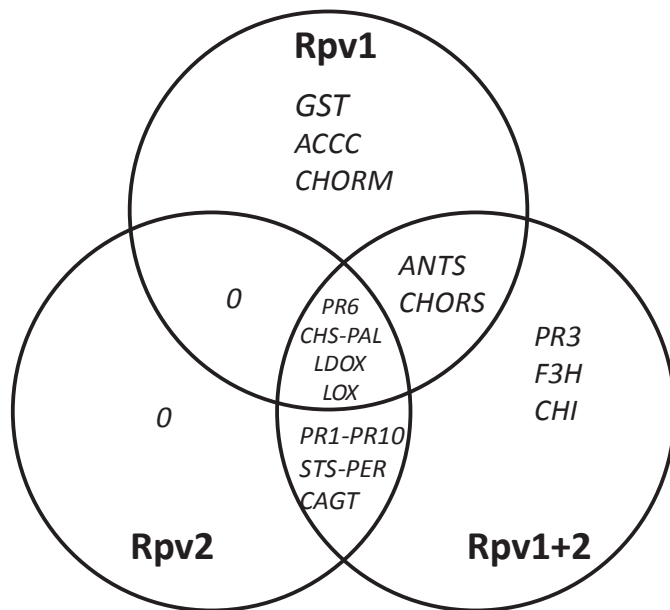


Figure 57 : Diagramme de Venn représentant les sur-expressions relatives des gènes dans les génotypes possédant les QTLs Rpv globalement sur les 24 heures d'étude (T0 et T24 confondus).

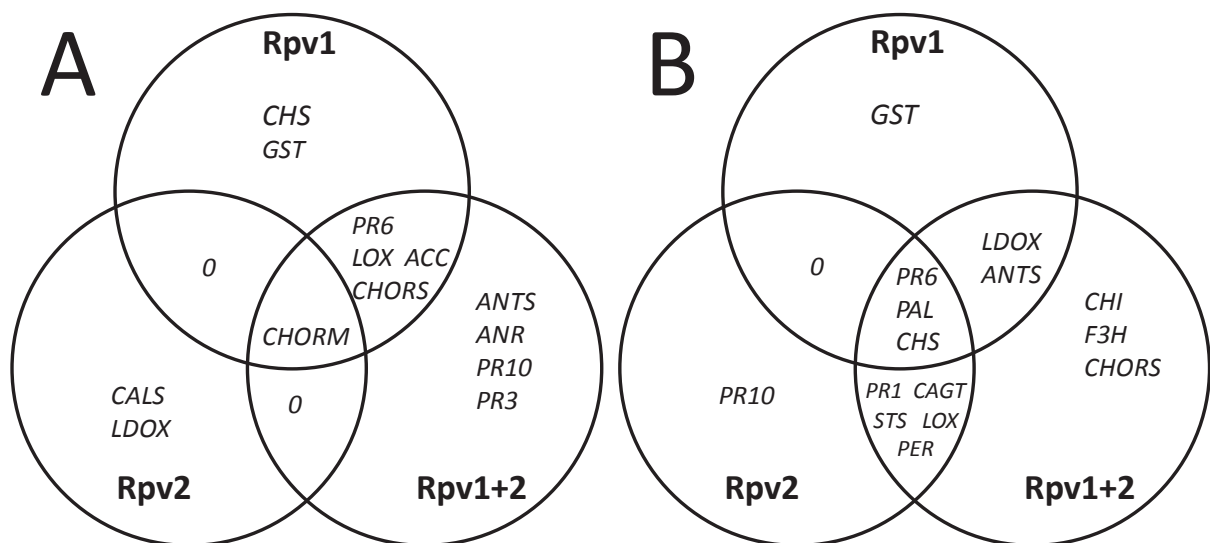


Figure 58 : Diagramme de Venn représentant les sur-expressions relatives des gènes dans les génotypes possédant les QTLs Rpv (A) juste avant inoculation et (B) 24 heures après prélèvement des feuilles.

Le génotype Rpv2 (N°7210), totalement résistant présente plus de surexpression de gènes codant pour différentes catégories de gènes (PR protéines, enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et impliqués dans le renforcement de la paroi) que les génotypes partiellement résistants (Tableau 27 et Figures 55B et 57B). Le nombre de gènes surexprimés dans les génotypes possédant les deux QTLs (Rpv1+2) peut correspondre soit à la somme des gènes observés dans les deux génotypes possédant un seul QTL (*e.g.* PR protéines et phénylpropanoïdes), soit à l'un des deux génotypes (*e.g.* Indoles *vs* Rpv1 et Paroi *vs* Rpv2), ou encore intermédiaire entre Rpv1 et Rpv2 (*e.g.* signalisation).

Tableau 27: Récapitulatif des surexpressions significatives obtenues dans les 3 génotypes résistants par classe de gènes durant les 24 heures d'étude (T0 et T24).

Gènes	Rpv1	Rpv2	Rpv1+2
PR protéines	1	3	4
Phénylpropanoïdes	3	4	7
Signalisation	3	1	2
Indoles	3	1	3
Paroi	0	2	2

	A					B				
	CS	Contrôle	Rpv1	Rpv2	Rpv1+2	CS	Contrôle	Rpv1	Rpv2	Rpv1+2
<i>PR1</i>	16.1	-15.0	23.1	-35.0	4.0	5.5	18.5	2.8	-1.1	-2.0
<i>PR2</i>	-1.7	-1.1	ND	2.1	15.7	6.0	-1.9	-5.2	-2.3	-1.5
<i>PR3</i>	-34.7	-2.3	8.6	-8.2	28.4	-1.2	-2.5	-6.5	-1.4	9.2
<i>PR6</i>	-1.6	-4.9	-3.4	5.1	48.8	5.9	10.2	4.3	-1.3	-2.3
<i>PR8</i>	-1.0	-9.8	2.3	-1.2	9.2	6.4	-1.3	-2.0	-2.2	-1.0
<i>PR10</i>	-16.0	56.5	13.3	-8.5	5.7	1.1	-1.1	1.8	1.1	12.5
<i>PGIP</i>	20.2	-24.5	6.7	-6.4	2.9	3.8	-1.8	-4.2	-1.9	-1.0
<i>PAL</i>	5.6	-2.9	-2.3	3.3	3.0	6.0	5.1	-2.6	-1.3	-9.0
<i>STS</i>	1.6	-8.7	52.5	-11.8	4.7	5.0	4.1	2.4	-1.4	-14.1
<i>CHI</i>	3.1	-46.4	-2.4	-40.3	2.3	6.8	1.5	-9.3	1.0	-1.4
<i>CHS</i>	5.8	-8.3	-6.2	-1.8	-1.1	6.7	3.5	-39.7	3.3	-1.7
<i>LDOX</i>	2.6	-24.3	8.2	-12.5	-2.7	4.4	-1.5	-58.4	-1.7	-1.6
<i>ANR</i>	2.3	-5.7	4.8	-7.8	-1.6	2.3	-1.0	-20.6	1.4	-1.3
<i>F3H</i>	-3.2	-10.0	43.4	-1.8	-3.3	3.1	2.5	-12.6	-1.2	-2.8
<i>LOX</i>	9.1	-4.0	2.7	-3.5	4.1	4.7	3.1	-2.8	-1.3	-11.9
<i>GST</i>	8.0	3.0	-5.5	1.9	3.9	3.9	-1.3	-7.3	-1.2	-1.1
<i>ACC</i>	6.0	-7.4	69.0	-44.9	3.3	1.8	-19.9	-76.6	-1.6	3.4
<i>ANTS</i>	1.7	-5.5	-1.4	-1.6	5.0	5.2	1.9	-15.2	2.5	-1.9
<i>CHORM</i>	4.0	-3.0	3.6	-5.3	2.6	3.7	-1.8	-17.6	1.5	-6.0
<i>CHORS</i>	-3.1	-6.9	-1.2	-1.9	3.5	4.4	2.0	-6.7	-1.4	-5.5
<i>CALS</i>	-1.2	-5.8	-1.2	-1.4	3.9	-1.1	-13.9	-20.6	2.1	58.4
<i>PER</i>	-13.1	-1.9	1.3	-1.1	1.5	4.5	1.8	-10.6	-1.8	-8.1
<i>CAGT</i>	5.5	1.2	4.5	-1.1	6.3	4.5	12.7	1.8	1.6	-41.3

Figure 59: Expression relative des gènes dans les feuilles des 5 génotypes en réponse à (A) une attaque de mildiou et (B) d'oïdium par rapport aux feuilles non traitées et non inoculées des génotypes correspondant.

Les analyses moléculaires montrent que les génotypes étudiés répondent rapidement au simple stress occasionné par le protocole expérimental (prélèvement des feuilles, avant tout autre traitement) en activant les mécanismes de défenses. Les réponses de la variété sensible sont précoces et limitées puisqu'ils sont rapidement mis en sommeil tandis que pour les génotypes résistants, les défenses sont rapidement et fortement mobilisées.

2.1.3. Comparaison des profils d'expression des différents génotypes après inoculation avec *P. viticola* et *E. necator*.

En prenant en compte comme significatif seulement les gènes présentant des valeurs d'expression relative (ER) supérieures ou égales à 3 (ou inférieures ou égales à -3), dans le cultivar Cabernet-Sauvignon, les réponses de la vigne à l'attaque de *P. viticola* et *E. necator* conduisent à une forte modification de l'expression des gènes de défense, étant plutôt en faveur d'une surexpression que d'une répression des gènes. Ainsi, 65,2 % des gènes sont-ils modulés après une attaque de mildiou (15 gènes sur 23), avec les 65% des transcrits étant surexprimés (10 gènes sur-exprimés sur 23) et 78,3 % après une attaque d'oïdium (18 gènes sur 23) (Figure 59A).

Précédemment, l'analyse des transcrits dans la vigne feuilles de Cabernet-Sauvignon montrait que 31,5% des gènes étaient sur-exprimés (6 gènes sur 19 présentant une expression relative >3), 24 heures après infection avec *P. viticola* et *E. necator* (Partie I Figure 3A et Tableau 3) suivi par une forte répression des gènes reflétant une suppression des réponses de défense dans les feuilles de vigne infectées. Dans cette nouvelle expérience, nous notons une réponse de défense de la variété sensible plus marquée 24 heures après infection.

Dans le génotype contrôle, nous notons une répression beaucoup plus importante après une inoculation de *P. viticola* (69,6 %) qu'après une inoculation d'*E. necator* (8,7%). Néanmoins, le niveau de sur-expression est faible dans les deux cas, 8,7 % et 21,7 % comparé au Cabernet-Sauvignon. Les génotypes possédant le QTL Rpv2 se comportent de façon similaire aux génotypes "Contrôle" à une attaque de mildiou (8,7 % des gènes surexprimés et 47,8 % de gènes réprimés). En revanche, en réponse à une attaque d'oïdium, seul le gène codant pour *CHS* est surexprimé. Les génotypes possédant le QTL Rpv1 (Rpv1 et Rpv1+2) réagissent à une attaque de mildiou en surexprimant 47,9 et 65,3 % des transcrits. Cependant, 13 et 4,3 % des transcrits sont réprimés. En réponse à une attaque d'oïdium, les génotypes possédant Rpv1 réagissent différemment en réprimant 65,2 % des gènes et surexprimant 8,7 % d'entre eux, et de façon plus modérée dans les génotypes Rpv1+2 (30,4 et 17,4 %, respectivement).

Le "Contrôle" est rapidement et fortement modulé négativement lors d'une attaque de mildiou mais répond plus fortement à une attaque d'oïdium avec la sur-expression de *PRI*, *PR2*, *PR6*, *PGIP*, *PAL*, *STS*, *CHI*, *CHS*, *LDOX*, *F3H*, *LOX*, *GST*, *ANTS*, *CHORM*, *CHORS*, *PER* et *CAGT*. Rpv2, présente une répression des gènes lors d'une attaque de mildiou, supposant une tentative de suppression des défenses de la plante par le pathogène. En revanche, après inoculation avec l'oïdium, il n'y a aucune modification. Le génotype Rpv1+2 réagit très rapidement et beaucoup plus intensément à une attaque de mildiou que les génotypes possédant un seul QTL (effet cumulatif possible). Les génotypes Rpv2, résistants à l'oïdium (Rpv2 et Rpv1+2) répondent peu à l'oïdium alors que Rpv1, peu résistant à l'oïdium, présente une forte répression des gènes lors de l'attaque de l'oïdium confirmant la suppression des défenses de la vigne pour son développement et rapidement une réponse de défense au mildiou.

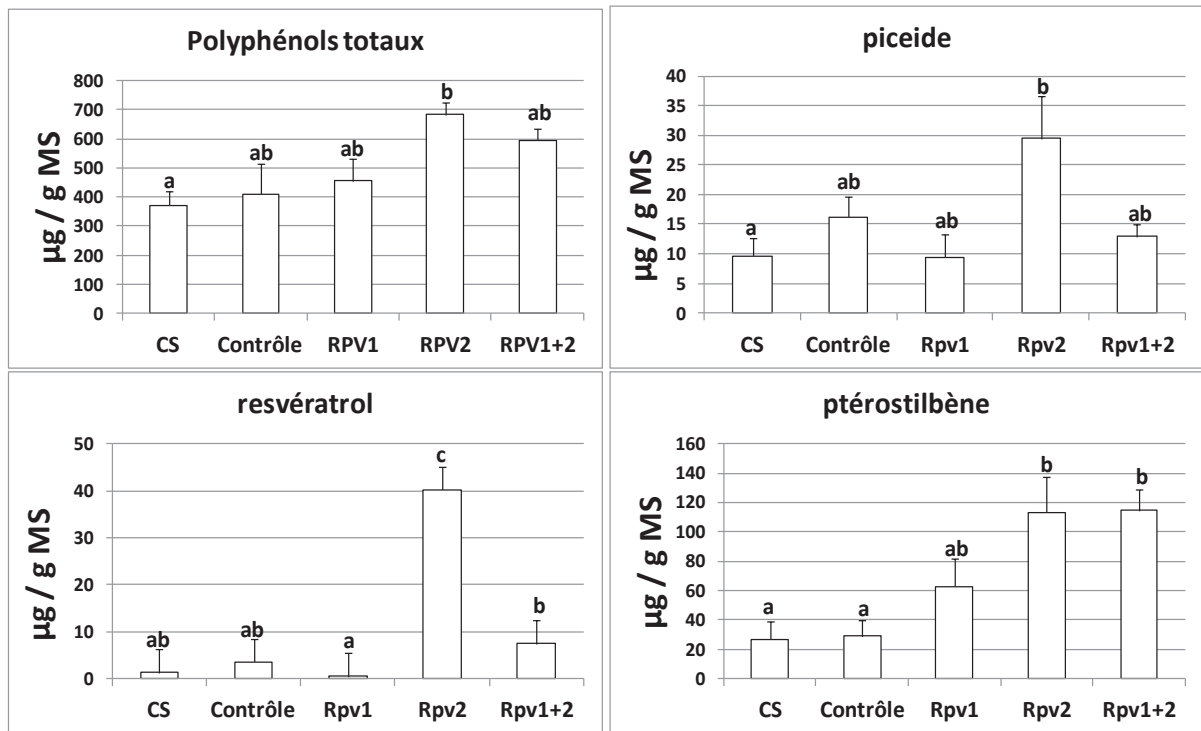


Figure 60: Teneur en stilbènes des feuilles témoins des 5 génotypes, obtenues par HPLC exprimées en µg par g de matière sèche.

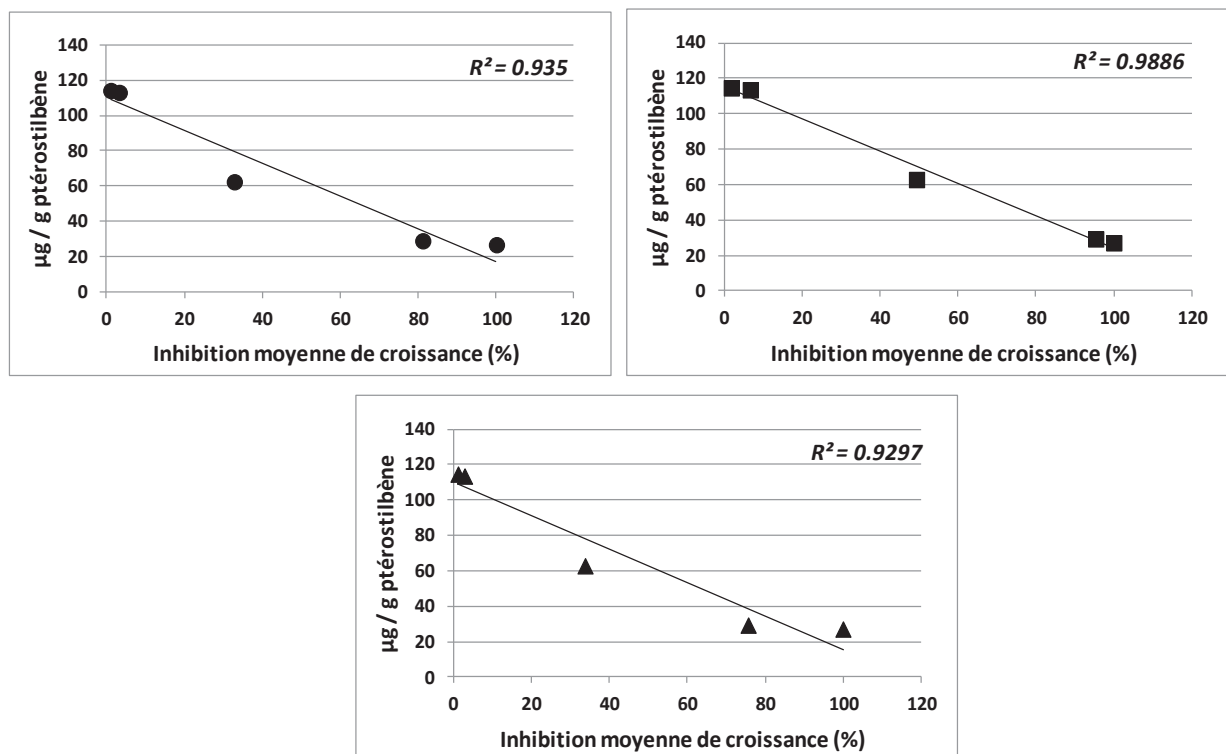


Figure 61 : Corrélation entre la teneur en ptérostilbène des feuilles des différents génotypes avant inoculation et la protection de la vigne contre le mildiou (●) et l'oïdium A (■) et B (▲).

2.1.4. Comparaison des profils en polyphénols des différents génotypes

La teneur en stilbènes des feuilles témoins varie de manière significative en fonction du génotype considéré (Figure 60).

Le génotype Rpv2 contient significativement plus de polyphénols totaux et de picéide que le cultivar Cabernet-Sauvignon. Dans les feuilles des génotypes Rpv1 et Rpv1+2, les quantités trouvées sont intermédiaires.

Concernant le resvératrol, nous observons une accumulation significative chez les génotypes résistants possédant le QTL (Rpv2) comparée aux autres génotypes. A noter que, sa teneur est significativement plus importante chez le génotype résistant possédant uniquement le QTL Rpv2, que dans le génotype possédant les deux QTLs (Rpv1+2). Rpv1 contiennent une teneur en resvératrol similaire à celles des génotypes sensibles. Les feuilles du génotype possédant les 2 QTLs (Rpv1+2) présente une teneur en resvératrol intermédiaire à celle trouvée dans les génotypes possédant un seul QTL (Rpv1 et Rpv2).

Les quantités de ptérostilbène sont également significativement plus importantes dans les génotypes possédants les QTLs Rpv2, que dans les génotypes sensibles CS et Contrôles. La quantité accumulée dans le génotype Rpv1 est intermédiaire. Il apparait que les quantités de ptérostilbène détectées sont d'autant plus importantes que le génotype est résistant. Ainsi obtenons-nous une corrélation positive entre la teneur en ptérostilbène et le niveau de protection du génotype considéré ($R^2=0,94$ pour le mildiou, $R^2=0,99$ pour l'oïdium de groupe A et $R^2=0,93$ pour l'oïdium de groupe B) (Figure 61).

Les teneurs des différents stilbènes étudiés chez les différents génotypes, sont fortement modulées en fonction du génotype. Ainsi, la quantité de stilbènes accumulés dans les feuilles de vigne est-elle directement corrélée ($R^2=0,99$) au niveau d'expression des gènes codant pour les deux enzymes majeures impliquées dans la voie de biosynthèse de ses métabolites (*PAL* et *STS*) (Figure 62). Il semble, que selon le fond génétique de la plante, les systèmes de défense soient déjà fonctionnels avant toute attaque, pouvant limiter ainsi rapidement la progression et le développement des agents pathogènes dans la plante lors d'une infection.

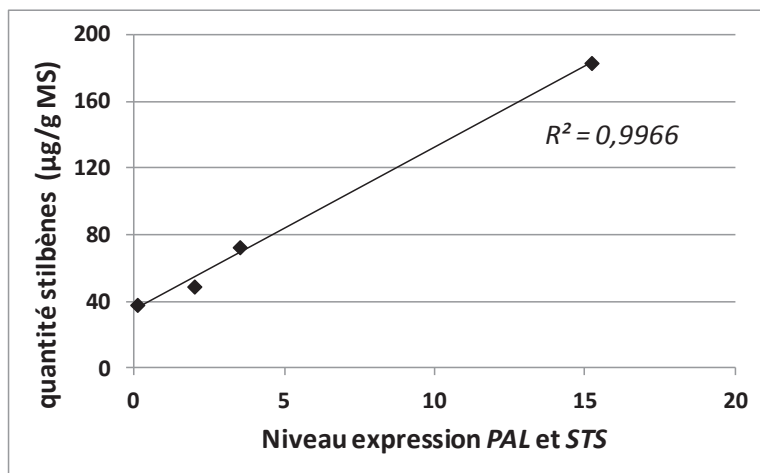


Figure 62: Corrélation entre le niveau d'expression moyen de *PAL* et *STS* dans les feuilles témoins des différents génotypes et la quantité de stilbènes présents dans les feuilles

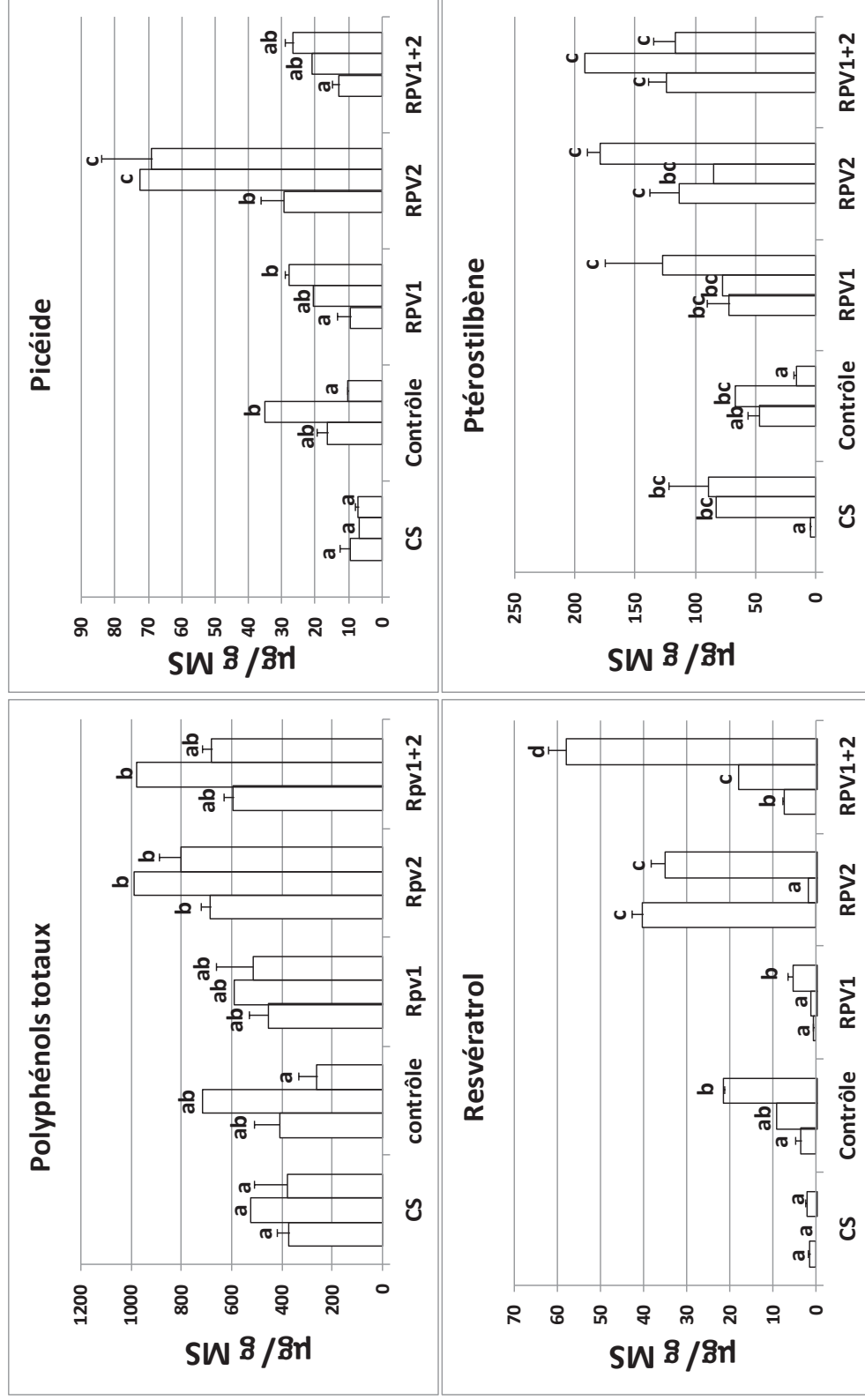


Figure 63 : Teneurs en stilbènes des feuilles de vigne des 5 génotypes, 24 heures après une inoculation de mildiou (-----) ou d'oidium (□) en comparaison avec les feuilles non traitées et non inoculées (□).

2.1.5. Comparaison des profils en polyphénols des différents génotypes après inoculation de mildiou et d'oïdium

Lors d'une infection (24 hpi), nous observons une forte accumulation significative du picéide dans les feuilles des génotypes Rpv2 inoculés avec l'oïdium, ainsi que dans les feuilles Rpv1 dans une moindre mesure. Dans les génotypes "Contrôle" et Rpv2 inoculés avec le mildiou, nous notons également une accumulation significative du picéide (Figure 63).

Une accumulation significative du resvératrol est observée après une attaque d'oïdium, quel que soit le génotype issu du croisement entre *Vitis* et *Muscadinia* considéré et après une attaque de mildiou, mais uniquement dans les feuilles du génotype Rpv1+2 (Figure 63). Nous observons également une chute de la quantité de resvératrol accumulé dans les feuilles des génotypes Rpv2 après l'attaque de mildiou, qui peut-être liée à l'augmentation de picéide décrite précédemment. Les génotypes Rpv2 et Rpv1+2 répondent bien à une attaque de mildiou et Rpv2 à une attaque d'oïdium et les génotypes "Contrôle" et Cabernet-Sauvignon répondent de façon intermédiaire.

Aucune accumulation de ptérostilbène significative n'est observée dans les différents génotypes après une inoculation avec les deux agents pathogènes comparée aux modalités non inoculées (Figure 63) à l'exception d'une accumulation significative obtenue dans les feuilles de Cabernet-Sauvignon infectées par le mildiou et l'oïdium comparable à celle présente dans les génotypes "Contrôle", Rpv1, Rpv2 après une attaque de mildiou.

2.2. Caractéristiques des différents génotypes de *Vitis* utilisés après traitement avec le BTH

2.2.1. Comparaison et comportement des différents génotypes au niveau biologique après traitement avec le BTH

Le traitement des différents génotypes avec une faible dose de BTH (à 0,47 mM, Figure 64A) induit une inhibition significative de la croissance des agents pathogènes en particulier pour le cultivar Cabernet-Sauvignon, les génotypes "Contrôle" et Rpv1. Pour les génotypes contenant Rpv2, nous obtenons une inhibition de croissance complète (Figure 64A) Sur les génotypes sensibles CS et "Contrôle", nous obtenons 60 et 78,8 % d'inhibition de la croissance pour le mildiou, et 100 à 98,3 % de réduction de croissance pour l'oïdium A et 73 et 98,3 % de réduction de croissance de l'oïdium B, respectivement.

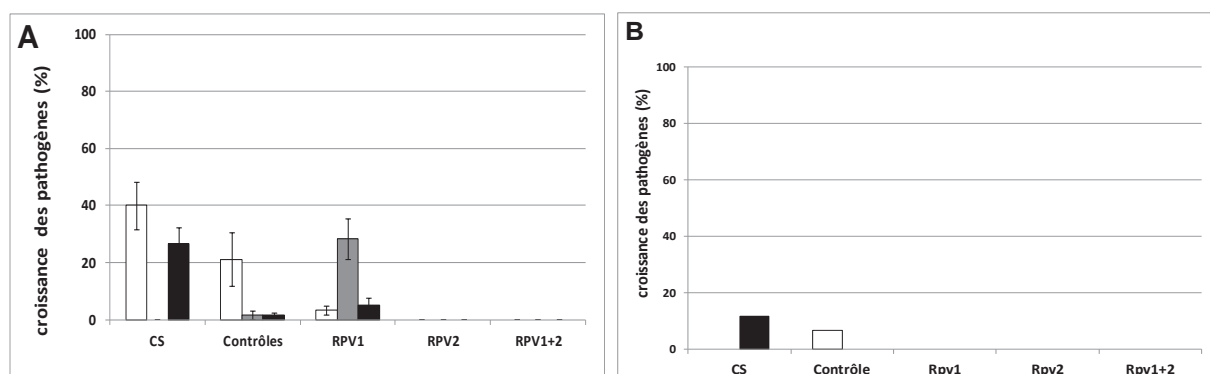


Figure 64 : Inhibition de la croissance de *P. viticola* (□) et d'*E. necator* de groupe A (■) ou de groupe B (■) sur les feuilles des différents génotypes pré-traités (A) avec 0,47 mM et (B) 1,90 mM de BTH 24 heures avant inoculation.

Les défenses de vigne induites par le BTH dans ces géotypes sensibles sont donc plus efficaces pour lutter contre l'oïdium que contre le mildiou, et particulièrement contre l'oïdium A sur Cabernet-Sauvignon.

L'élicitation du géotype Rpv1 par le BTH à la dose de 100 mg/L (0,47 mM) ne change pas le niveau de protection contre le mildiou (environ 95 % d'inhibition de croissance) et induit une protection contre l'oïdium plus intense pour les souches de groupe B (de 60,2 à 95 % d'inhibition de croissance après traitement) que pour les souches de groupe A (de 4 à 71,7 % d'inhibition de croissance après le traitement) (Figure 64A). L'application d'une concentration de 400 mg/L de BTH rend les géotypes Rpv1 totalement résistants au mildiou et à l'oïdium (Figure 65 B)

Pour les géotypes contenant le QTL Rpv2 (Rpv2 et Rpv1+2), le traitement BTH rend ces géotypes totalement résistants à l'oïdium. La dose de 100 mg/L de BTH suffit donc pour induire dans ces géotypes des défenses totales contre les deux pathogènes biotrophes majeurs de la vigne (Figure 65).

Le BTH administré à la concentration de 400 mg/L (1,90 mM) permet de protéger les géotypes sensibles contre le mildiou et l'oïdium. Nous obtenons une croissance de 11,6 % avec l'oïdium de groupe B sur Cabernet-Sauvignon et 6,6 % de croissance du mildiou sur le géotype "Contrôle", correspondant à un développement mycélien avec peu ou pas du tout de production des conidies (Figure 64B).

2.2.2. Comparaison des profils d'expression des différents géotypes après traitement avec le BTH

Le BTH induit des modifications de l'expression des gènes dans les feuilles de vigne mais variables selon le fond génétique de la plante.

Ainsi, dans le cultivar Cabernet-Sauvignon, il induit très rapidement (24 heures après le traitement) la surexpression de gènes (17,4 %) codant principalement pour des PR protéines (*PR1-PR6-PR10*), d'un gène impliqué dans le renforcement des parois (*CAGT*) (Figure 65). Quarante huit heures après le traitement, 56,5% des gènes sont modulés significativement en incluant les gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des indoles (*PAL*, *STS*, *CHI*, *CHS*, *ANR*, *F3H*, *ANTS* et *CHORS*), dans la signalisation (*LOX* et *GST*) (Figure 65). Les résultats obtenus sont en accord avec ceux précédemment décrits (Partie I).

Dans le géotype sensible issu du BC1 entre *Vitis* et la muscadine, le BTH induit également une surexpression rapide (24 hpt) de PR protéines (*PR3*, *PR6* et *PR10*), d'un gène impliqué dans la voie de biosynthèse des indoles (*CHORM*) et dans le renforcement des parois (*CALS* ou *CAGT*) et du transcrit GST avec, respectivement 34,8 et 21,7 % des gènes surexprimés, 24 et 48 heures après traitement (Figure 65A).

Le BTH stimule fortement l'expression des transcrits dans les géotypes Rpv1 et Rpv2, 48 heures après traitement, avec la sur-expression des transcrits *PR1*, *PR3*, *PR8* et *PR10* dans Rpv1, *PR2*, *PR8* et *PGIP* dans Rpv2, et des gènes *STS* et *CHI* dans Rpv1 ou *CHI*, *CHS*, *ANR* et *F3H* dans Rpv2, impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, ou encore les gènes *ACC* dans Rpv1 et *GST*, *CALS* et *CAGT* dans Rpv2 conduisant à 30,4 et 43,5 % des gènes surexprimés respectivement (Figure 65 B et 66).

	A					B				
	CS	Contrôle	Rpv1	Rpv2	Rpv1+2	CS	Contrôle	Rpv1	Rpv2	Rpv1+2
<i>PR1</i>	27.2	2.4	-2.7	1.1	2.3	20.0	3.4	5.1	-12.5	-1.1
<i>PR2</i>	2.5	2.1	-1.9	-1.2	2.0	-4.7	-4.4	2.7	7.0	15.9
<i>PR3</i>	2.3	9.3	9.1	1.3	8.7	-8.5	-4.3	4.2	2.1	9.1
<i>PR6</i>	3.4	4.2	-3.7	1.8	-1.4	23.2	4.6	1.1	1.4	3.2
<i>PR8</i>	-3.2	1.0	-1.9	-4.1	-3.6	3.9	-5.0	3.1	60.3	-1.3
<i>PR10</i>	3.8	12.9	3.9	1.9	1.1	-13.7	46.7	4.2	-2.6	2.1
<i>PGIP</i>	-1.1	-1.1	1.2	-1.4	1.4	-2.6	-8.2	2.4	3.8	-1.6
<i>PAL</i>	1.6	1.0	-1.1	1.2	1.5	3.9	2.3	-3.9	-9.9	1.0
<i>STS</i>	-2.1	1.7	-1.4	-1.7	-1.2	7.1	1.6	29.1	-41.6	1.2
<i>CHI</i>	-1.1	-1.5	1.6	2.1	-1.2	5.3	-3.7	11.1	5.4	-1.1
<i>CHS</i>	-2.5	1.0	-1.8	-1.1	2.9	6.6	1.1	-2.8	5.6	-1.1
<i>LDOX</i>	-1.1	-1.8	1.4	-2.3	2.1	-1.0	-3.2	-1.5	2.1	-1.4
<i>ANR</i>	2.0	-1.2	-1.2	1.2	1.0	3.5	-5.0	1.3	4.4	-1.5
<i>F3H</i>	-1.6	-1.9	1.2	nd	-1.1	8.8	-1.3	-1.2	11.9	-1.4
<i>LOX</i>	-1.4	4.6	1.2	1.9	2.5	30.9	1.0	-1.4	-1.1	2.0
<i>GST</i>	-2.3	5.5	-1.0	19.3	2.3	5.0	11.1	1.6	3.8	1.3
<i>ACC</i>	-1.6	3.1	-5.1	17.6	-1.8	1.4	-22.9	3.5	-6.4	-1.2
<i>ANTS</i>	-1.3	1.6	1.2	-7.2	2.2	5.8	-1.3	-2.7	2.7	1.2
<i>CHORM</i>	-1.6	4.0	-2.5	-2.3	-4.5	2.1	-6.6	2.0	2.7	-1.1
<i>CHORS</i>	-3.5	2.2	-3.1	5.0	1.2	3.3	-1.3	2.0	2.1	-1.4
<i>CALS</i>	-1.5	24.0	15.9	1.2	1.1	-1.4	-34.7	1.6	22.5	3.3
<i>PER</i>	-2.1	1.0	1.4	-1.8	-1.6	-2.6	-1.8	2.0	2.6	-2.4
<i>CAGT</i>	4.6	1.8	1.6	-4.4	1.5	6.5	2.8	1.3	3.6	-1.3

Figure 65: Expression relative des gènes dans les feuilles des 5 génotypes (A) après 24 et (B) 48 heures de traitement au BTH à 1,90 mM (400 mg L⁻¹) par rapport aux feuilles témoin non traitées correspondantes

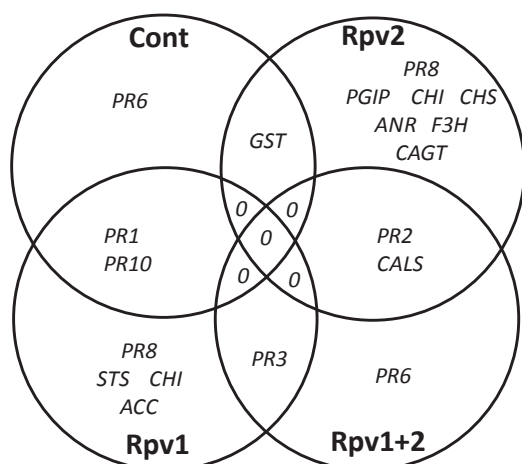


Figure 66: Diagramme de Venn représentant les sur-expressions obtenues dans les feuilles 48 heures de traitement au BTH à 1,90 mM (400 mg L⁻¹) par rapport aux feuilles témoin non traitées correspondantes

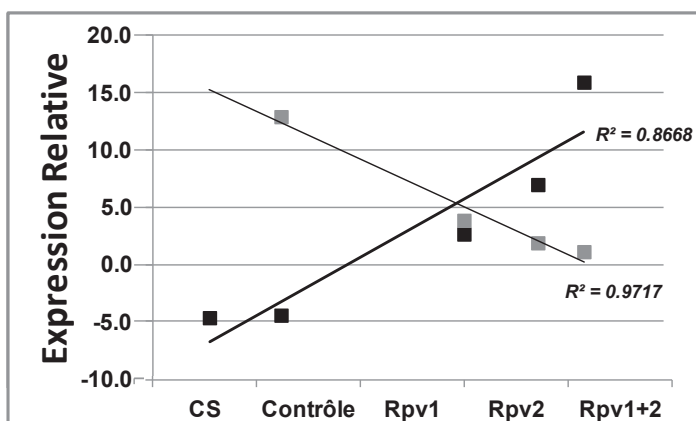


Figure 67 : Corrélation entre le niveau d'expression moyen de *PR10* (■) et *PR2* (■) dans les feuilles des différents génotypes et la sensibilité des génotypes au mildiou.

	A					B				
	CS	Contrôle	Rpv1	Rpv2	Rpv1+2	CS	Contrôle	Rpv1	Rpv2	Rpv1+2
<i>PR1</i>	86.9	-14.7	-3.4	-11.5	3.7	5.0	5.1	4.1	3.1	-1.6
<i>PR2</i>	5.0	1.2	2.9	-1.9	26.8	4.0	4.1	25.8	2.9	-2.6
<i>PR3</i>	23.7	-3.7	9.7	-2.9	96.4	4.9	18.5	28.8	3.7	3.0
<i>PR6</i>	6.5	2.1	-1.3	2.0	30.3	1.0	-1.1	7.9	4.5	68.0
<i>PR8</i>	-2.0	-50.4	-18.4	2.0	4.4	6.0	1.5	-1.9	4.1	4.0
<i>PR10</i>	2.0	-42.3	32.4	-8.6	-3.7	6.0	3.5	-3.5	13.5	3.1
<i>PGIP</i>	77.9	3.2	68.4	4.6	2.3	4.9	-1.3	5.2	1.7	5.6
<i>PAL</i>	-4.9	1.2	-10.4	1.4	-1.0	-1.0	-2.5	-1.6	2.9	54.3
<i>STS</i>	1.1	-2.5	1.6	-75.4	3.2	3.3	-1.8	2.4	2.1	5.2
<i>CHI</i>	-69.2	-36.8	29.1	-24.0	-2.0	5.0	-1.9	2.1	1.8	3.7
<i>CHS</i>	-65.6	-5.9	-41.5	-1.7	-8.7	5.9	10.2	45.3	3.1	2.6
<i>LDOX</i>	-10.6	-4.6	-1.5	-24.9	-32.4	4.0	3.1	3.9	3.2	-2.1
<i>ANR</i>	-2.7	-20.5	-4.0	-13.0	-22.7	3.7	-1.5	-5.4	2.2	3.6
<i>F3H</i>	-5.3	-93.2	29.2	-25.5	-26.8	3.2	-1.3	1.4	3.4	5.2
<i>LOX</i>	-1.8	-2.8	-36.5	-12.0	2.5	1.8	-19.9	-21.7	2.5	19.2
<i>GST</i>	1.5	6.5	-13.2	1.2	17.3	2.2	-1.0	-1.4	5.8	4.2
<i>ACC</i>	1.9	-1.4	-1.4	-11.8	-1.8	5.2	1.9	-3.0	9.9	3.0
<i>ANTS</i>	-1.2	-5.3	-9.7	-2.9	1.9	3.5	-1.8	-1.8	6.1	-1.2
<i>CHORM</i>	1.5	-3.4	-10.3	-6.4	1.6	3.8	2.0	2.8	2.9	-1.1
<i>CHORS</i>	-3.7	-5.7	-11.0	-2.3	1.2	2.6	2.5	-1.2	3.5	2.0
<i>CALS</i>	-2.5	ND	-10.4	2.1	1.5	1.4	-13.9	-9.0	ND	33.9
<i>PER</i>	-41.0	-2.9	-38.6	-1.1	-12.2	4.0	1.8	3.5	2.3	-1.4
<i>CAGT</i>	-1.9	-10.3	-3.4	-5.9	2.4	6.5	6.5	8.7	6.6	-6.5

Figure 68: Expression relative des gènes dans les feuilles des 5 génotypes prétraités avec 1,90 mM (400 mg L⁻¹) de BTH, 24 heures après inoculation avec (A) le mildiou et (B) l'oïdium B par rapport aux feuilles des génotypes correspondant non inoculées et non traitées.

La stimulation induite par le BTH dans le génotype possédant les deux QTLs semble plus modérée puisque seul les gènes codant pour *PR3* sont induits 24 heures après le traitement, et les gènes *PR2*, *PR3*, *PR6* et *CALS*, 48 heures après le traitement (soit 8,7 et 17,4 % des gènes sur-exprimés).

Les transcrits *PR1* et *PR6* sont induits dans les génotypes sensibles (CS et Contrôle) et dans le génotype partiellement résistant (Rpv1).

Dans tous les descendants du croisement, *PR10* est d'autant plus stimulée par le BTH que le génotype est sensible et inversement pour *PR2* qui est d'autant plus exprimé que le génotype est résistant (2,7 dans Rpv1 et 7,0 dans Rpv2) et son expression est cumulative dans le génotype possédant les 2 QTLs (15,9 dans Rpv1+2) (Figure 67). Les transcrits de *PR1*, *PR2*, *PR3* et *PR10* semblent à nouveau être de bons marqueurs de résistance.

L'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes n'est modifiée que 48 heures après le traitement avec le BTH dans les génotypes Rpv1 et Rpv2 mais aussi dans la variété Cabernet-Sauvignon, avec une sur-expression des gènes *PAL*, *STS*, *CHI*, *CHS*, *ANR* et *F3H* variant selon le génotype.

Les gènes *CALS* et *PER*, impliqués dans le renforcement de la paroi sont stimulés précocement (24 hpt) dans les génotypes Contrôle et Rpv1 et plus tardivement (48 hpt) dans les génotypes possédant le QTL Rpv2.

Au global, sur les 2 jours étudiées, nous observons que l'ensemble des gènes étudiés ont subi des modifications d'expression en réponse au traitement BTH, avec des résultats très variables selon le fond génétique considéré, avec une tendance d'une modulation plus importante dans les feuilles des génotypes sensibles que dans les génotypes présentant des résistances. Ainsi, ceux sont les feuilles de CS qui surexpriment le plus de transcrits et dans les feuilles de Rpv1+2 que nous voyons l'expression la plus faible (Figure 65).

2.2.3. Comparaison des profils d'expression des différents génotypes après traitement avec le BTH en réponse à l'attaque de mildiou et d'oïdium

Les réactions de défense de la vigne élicitée par le BTH en réponse à une attaque de mildiou, au niveau moléculaire, concernent principalement la modulation de l'expression de gènes codant pour des PR protéines.

La variété Cabernet-Sauvignon et les génotypes possédant le QTL Rpv1 (Rpv1 et Rpv1+2) présentent le plus fort taux de surexpression puisque 21,7, 26,1 et 30,4 % des gènes étudiés sont surexprimés avec 100, 66,7 et 71,4 % codant pour des PR protéines (*PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR6*, *PR8*, *PR10* et *PGIP*) (Figure 68 A).

L'ensemble des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes sont significativement réprimés dans tous les génotypes traités en réponse à l'attaque de mildiou. Cependant, le génotype Rpv1 élicite surexprime *CHI* et *F3H*, deux gènes codant pour des enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes comme la catéchine et épicatechine. À l'inverse, le génotype Rpv1+2 surexprime le transcrit de la silbène synthase (*STS*) (Figure 67A).

La *PAL* et *STS* sont fortement réprimés, notamment dans le génotype Rpv2, en accord avec les résultats obtenus au niveau biochimique (Figure 62), où nous notons une diminution des quantités de resvératrol dans ces mêmes feuilles après inoculation de mildiou.

L'ensemble des gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse des indoles et ceux impliqués dans le renforcement de la paroi sont également significativement réprimés 24 heures après une infection avec le mildiou. Seul le transcrit de la *GST*, impliquée dans le maintien du statut redox de la plante est fortement induit en réponse à l'attaque de mildiou dans les génotypes : Contrôle et Rpv1+2 traités par le BTH.

Les réponses de défenses mises en place pour lutter contre l'oïdium, induites par le traitement BTH dans l'ensemble des génotypes étudiés impliquent une surexpression générale des gènes étudiés. Toutefois, le gène codant pour *PR6* est surexprimé uniquement dans les génotypes Rpv (Rpv1, Rpv2 et Rpv1+2), tandis que *PR3* et *CHI* sont significativement surexprimés quel que soit le génotype considéré. Le gène codant pour *PAL* est surexprimé uniquement dans les génotypes possédant le QTL Rpv2 (Rpv2 et Rpv1+2).

Le développement du mildiou est plus rapide que celui de l'oïdium (7 jours et 12 jours, respectivement), il est donc possible que les réponses de défenses contre le mildiou apparaissent plus précocément que celles contre l'oïdium avant 24 heures, expliquant que les expressions soient plus intenses 24 heures après une attaque d'oïdium que de mildiou, car déjà réalisées antérieurement.

Si l'on compare les profils obtenus après traitement avec le BTH et l'infection (Figure 68) et ceux obtenus en absence d'élicitation (Figure 59), on note globalement moins de sur-expression de gènes 24 heures après le traitement BTH, suggérant que les sur-expressions se sont déjà déroulées avant 24 heures, lors de l'infection par le mildiou. En revanche, 24 heures après une inoculation avec l'oïdium, les feuilles pré-traitées avec le BTH conduisent à une sur-expression plus importante dans les feuilles.

2.2.4. Comparaison des profils en polyphénols des différents génotypes après traitement avec le BTH

Comme attendu, l'analyse quantitative des stilbènes dans les feuilles des différents génotypes traitées avec le BTH à 400 mg/l ne révèle aucune différence significative des teneurs après 24 ou 48 heures de traitement avec le BTH et le traitement n'induit pas de modifications significatives des teneurs en polyphénols totaux dans les feuilles des génotypes considérés en accord avec les résultats obtenus dans la partie I (Figure 69).

Les quantités de picéide détectées dans les feuilles de l'ensemble des génotypes traités au BTH ne sont pas significativement différentes de celles présentes dans les feuilles non traitées. À noter qu'en absence de traitement BTH, les feuilles du génotype Rpv2 contiennent significativement plus de picéide que les feuilles de l'ensemble des génotypes non traités ($29,52 \pm 7,04$ µg/g de matière sèche). En revanche, après traitement, les feuilles du génotype Rpv2 contiennent des quantités de picéide similaires à celles des autres génotypes ($7,11 \pm 1,63$ µg/g de matière sèche).

Concernant le resvératrol, son contenu dans les feuilles des génotypes sensibles (CS et contrôle), Rpv1 et Rpv1+2, après traitement avec le BTH sont similaires à celles des génotypes non traités. Seules les feuilles Rpv2 accusent une diminution des quantités de resvératrol, après un traitement avec le BTH (de $40\mu\text{g/g MS}$ à $0,87\mu\text{g/g MS}$). À noter toutefois, une accumulation significativement plus importante du resvératrol dans les feuilles du génotype Rpv1+Rpv2 traité, comparé aux quantités trouvées dans les feuilles des autres génotypes Rpv traités.

Nous notons également qu'il n'y a pas d'effet significatif du traitement avec le BTH sur l'accumulation de pterostilbène comparée aux modalités non traitées.

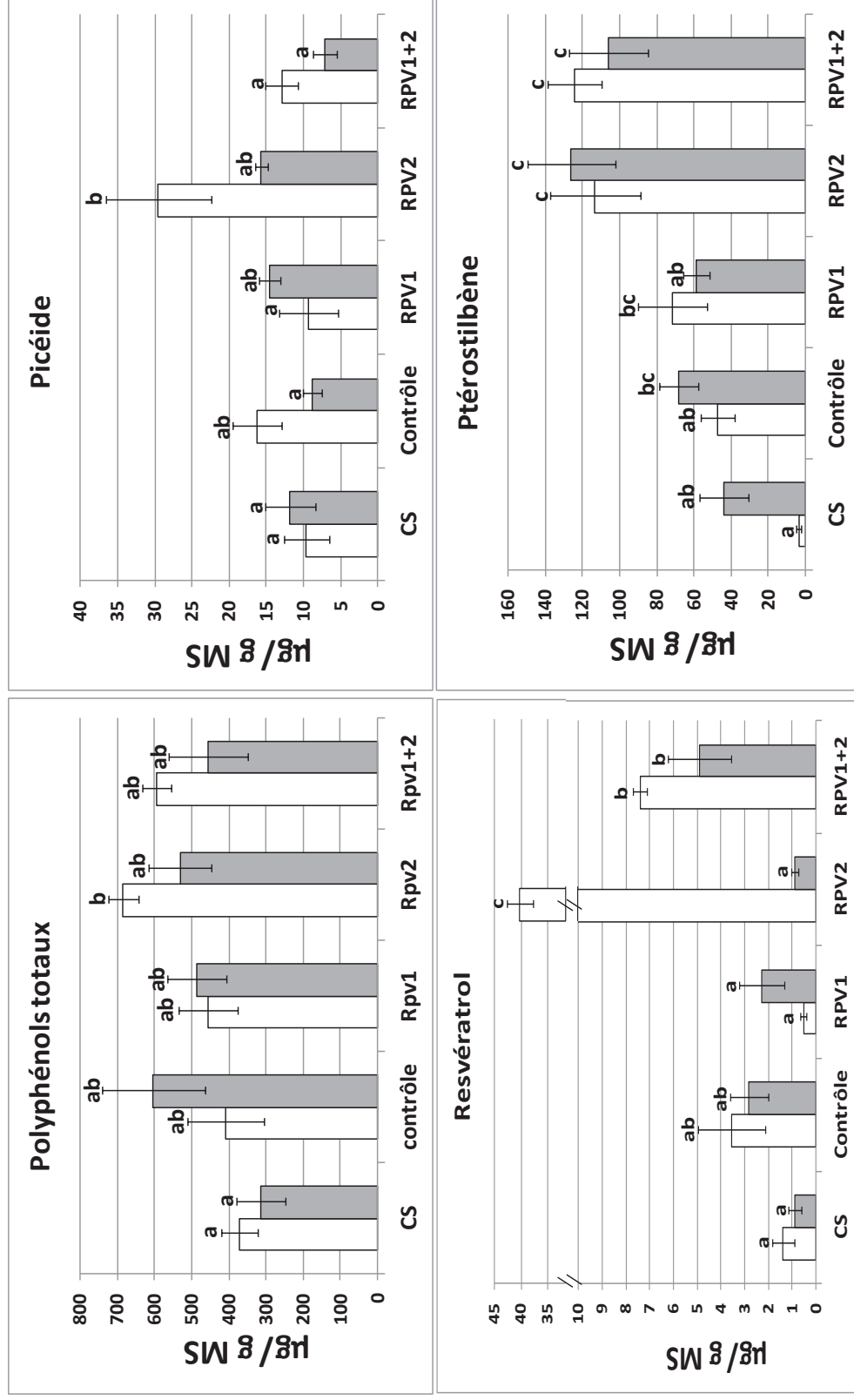


Figure 69 : Teneurs en stilbènes des feuilles traitées avec 1,90 mM de BTH (■) en comparaison avec les feuilles non traitées (□).

L'élicitation avec le BTH n'a pas permis d'augmenter significativement les quantités des polyphénols étudiés. Ces résultats sont des arguments supplémentaires au fait que ces composés semblent être peu impliqués dans l'acquisition de la résistance des génotypes de vigne étudiés.

2.2.5. Comparaison des profils en polyphénols des différents génotypes après traitement avec le BTH en réponse à l'attaque de mildiou et d'oïdium

Les quantités de polyphénols totaux restent similaires dans les génotypes prétraités après infection avec les deux agents pathogènes ($509 \pm 43 \mu\text{g/g}$ de matière sèche), excepté pour le génotype Rpv2 qui voit les quantités significativement augmentées ($972 \mu\text{g/g}$ de matière sèche).

Seule une accumulation significative de picéide est observée dans les feuilles du génotype Rpv2 prétraitées avec le BTH et inoculées avec le mildiou ($59,96 \mu\text{g/g}$ de matière sèche), similaire à celles des feuilles non traitées et inoculées ($70 \pm 2.5 \mu\text{g/g}$ de matière sèche) (Figure 70). Pour les autres génotypes, la teneur en picéide est similaire à celle trouvée dans les feuilles traitées ou non.

Les teneurs en resvératrol enregistrées dans les feuilles traitées avec le BTH et inoculées sont identiques à celles trouvées dans les feuilles témoins ou traitées avec le BTH pour l'ensemble des génotypes résistants, à l'exception du génotype Rpv2, pour lequel, seules les feuilles non inoculées révèlent une teneur en resvératrol importante.

Concernant le ptérostilbène, les quantités trouvées dans les différents génotypes ne montrent aucune différence significative quel que soit le traitement (traités ou non au BTH et inoculés ou non). Seule une accumulation significative dans les feuilles du génotype sensible Cabernet Sauvignon traitées ou non avec BTH puis infectées par l'oïdium et le mildiou a été observée (Figures 62, 69 et 70).

Les génotypes résistants présentent des teneurs en polyphénols naturellement élevées, suffisantes pour protéger la plante d'une agression et l'élicitation n'induit pas d'accumulation supplémentaires. Ces molécules ont un fort pouvoir antioxydant, pouvant être néfaste pour la survie de la cellule qui les fabrique. Une production excessive pourrait lui être fatale. La vigne module ses défenses lorsqu'elles sont limitées (dans les génotypes sensibles ou partiellement résistants) mais pas dans les génotypes résistants. Nous confirmons encore une fois que ces composés stilbéniques étudiés sont de bons marqueurs de niveau de résistance, et plus particulièrement le ptérostilbène pour lequel sa teneur semble fortement corrélée avec le niveau de protection des variétés sensibles ou partiellement résistantes.

3. Conclusions, discussions et perspectives

L'objectif principal de ce travail visait à préciser le rôle du BTH dans l'élicitation des défenses de la vigne en fonction du fond génétique de la plante et d'évaluer la capacité de génotypes possédant des niveaux de résistance variés à répondre à cette élicitation. Ainsi, différents génotypes issus d'un croisement entre une variété sensible *Vitis vinifera* et une variété résistante *Muscadinia rotundifolia* ayant ou non introgressé des QTLs de résistance contre les pathogènes biotrophes (*E. necator* et *P. viticola*) ont été choisis afin d'étudier et de comparer leurs réponses après élicitation, et après ou non infection avec différents pathogènes.

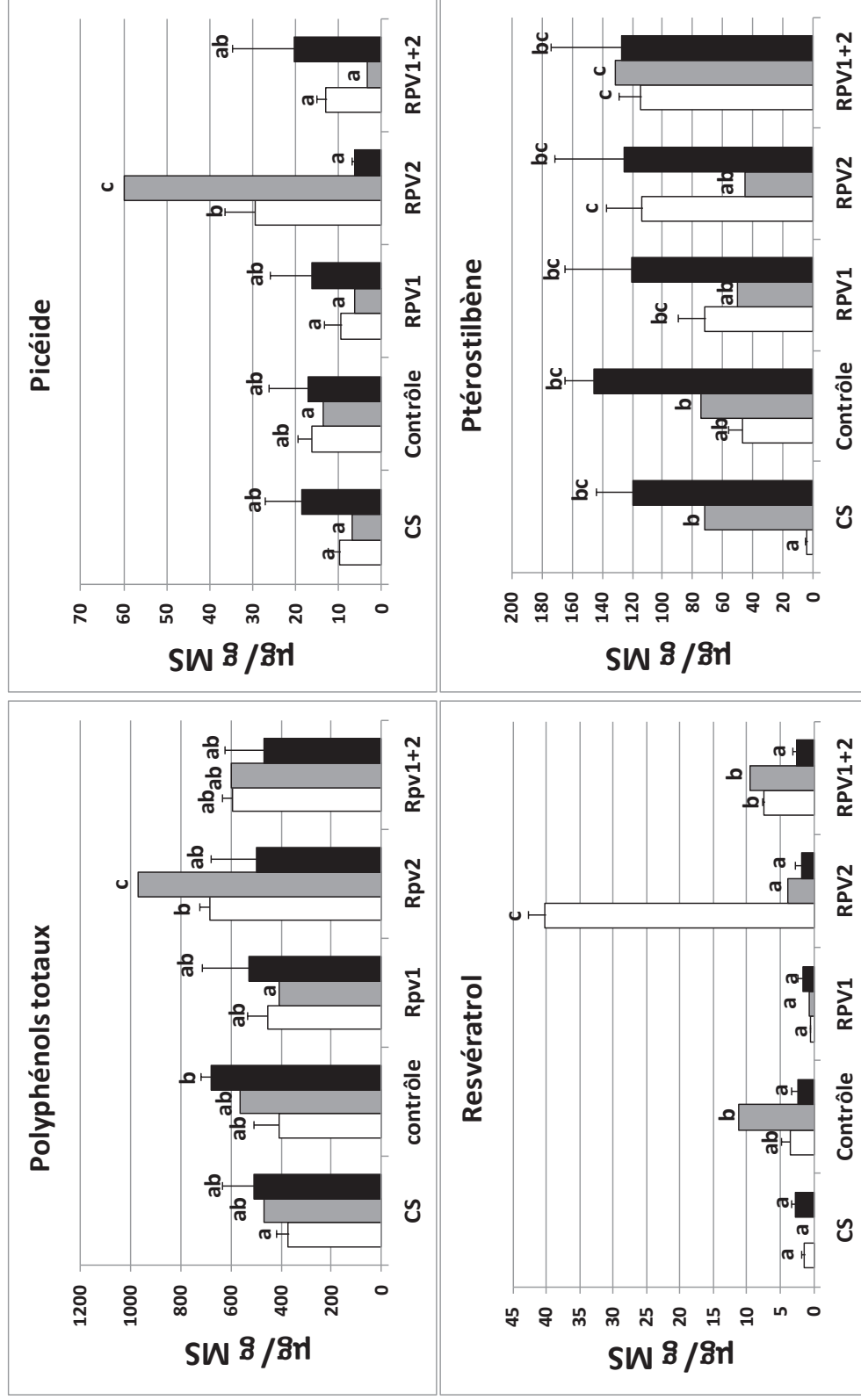


Figure 70 : Teneurs en stilbènes des feuilles traitées avec 1,90 mM de BTH en réponse à l'attaque de mildiou (■) et d'oïdium (□) comparées aux feuilles non traitées et non inoculées (□).

▪ *Comportement des géotypes résistants selon la variabilité génétique des agents pathogènes*

Nous avons évalué la réponse des géotypes face à des attaques de 13 souches d'*E. necator* appartenant à deux groupes génétiquement distincts (A et B) et face à des souches de *P. viticola*. Les géotypes sensibles issus du croisement entre Cabernet-Sauvignon et *M. rotundifolia* (dit "Contrôle" dans notre étude) sont moins sensibles au mildiou et à l'oïdium que le cépage Cabernet-Sauvignon utilisé au laboratoire, suggérant que ces géotypes sensibles possèdent certainement quelques QTLs de résistance mineurs à ces deux agents pathogènes.

Le QTL RUN, impliqué dans une résistance complète à l'oïdium est décrit comme étroitement lié au QTL Rpv1 (Barker *et al.*, 2005). Les résultats obtenus dans mon étude, avec le géotype Rpv1 ne correspondent pas à ceux attendus. En effet, ils montrent une sensibilité à l'oïdium, mais aussi une différence significative de sensibilité de ce QTL Rpv1 selon le groupe génétique d'oïdium considéré ($P=0.000$). Ainsi, une plus faible résistance de ce géotype face à 8 souches d'oïdium de groupe A est-elle observée (Figure 54), que nous retrouvons dans le protocole expérimental mis spécifiquement en place pour les analyses moléculaires et biochimiques. Le niveau de résistance du géotype Rpv1 est significativement plus fort contre la souche PV 74 (de groupe B) que contre la souche LLU41 (de groupe A).

Il semblerait que le QTL "RUN1" ne soit pas totalement fonctionnel dans ce géotype Rpv1 et que les souches d'oïdium de groupe A soient moins sensibles aux défenses mises en place dans les géotypes Rpv1 que les souches d'oïdium de groupe B.

Le géotype possédant seulement le QTL Rpv2, comme attendu, est totalement résistant au mildiou, mais de façon plus surprenante est également totalement résistante à l'oïdium.

De façon inattendue, les géotypes obtenus dans cette descendance entre *Vitis vinifera* et *Muscadinia rotundifolia* n'ont pas le phénotype attendu. Les Rpv1 sont sensibles à l'oïdium par absence (ou non fonctionnalité) du QTL RUN1 et les Rpv2 sont résistants à l'oïdium comme s'ils avaient introgressé le QTL RUN1, ou le QTL Rpv2 est un QTL conférant aussi de la résistance à l'oïdium. Dans la sélection assistée par marqueurs, du fait de l'*a priori* que les QTL Rpv1 et RUN sont liés, les marqueurs moléculaires utilisés pour suivre dans la descendance l'introgession du QTL RUN sont ceux de Rpv1. Or dans les géotypes utilisés, les 2 QTLs ne semblent pas totalement liés. La recherche de nouveaux marqueurs moléculaires bien spécifiques de RUN semble indispensable pour confirmer la présence du QTL RUN1 dans les géotypes.

Les géotypes possédants les deux QTLs (Rpv1+2) sont, comme attendus, totalement résistants au mildiou et fortement résistants à l'oïdium.

Des pulvérisations à 100 et 400 mg/L de BTH protège la vigne efficacement quel que soit le pathogène considéré, tant chez les géotypes sensibles que chez les autres géotypes, avec toutefois une moins bonne efficacité anti-oïdium A, qu'anti-oïdium B et anti-mildiou. Nous remarquons également que le BTH n'a pas d'effet phytotoxique sur les géotypes résistants Rpv2 et Rpv1+2 qui sont totalement résistants à l'oïdium et au mildiou.

▪ *Effet et intérêt d'une élicitation BTH*

La résistance systémique acquise (SAR) induite par le BTH chez les plantes sensibles a clairement été démontrée comme dépendante de la voie de signalisation de l'acide salicylique

(Friedrich *et al.*, 1996) et s'accompagne d'une surexpression significative de gènes codant pour des PR protéines (Lawton *et al.*, 1996; Brisset *et al.*, 2000; Bovie *et al.*, 2004; Hukkanen *et al.*, 2008, Kortekamp, 2006, Van Loon *et al.*, 2006), d'une accumulation de composés phénoliques (Iriti *et al.*, 2004), et aussi de changements dans l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme primaire (Verica *et al.*, 2004; Hukkanen *et al.*, 2008).

La vigne est capable de moduler les niveaux d'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de défenses, en réponse à une attaque de pathogène ou à l'application du BTH, mais leurs expressions varient selon le génotype de la plante et en fonction du pathogène rencontré.

Nos résultats montrent qu'une reprogrammation du transcriptome a lieu seulement dans les variétés sensibles (Cabernet Sauvignon et Contrôle) en réponse à une attaque d'oïdium en accord avec Fung *et al.*, (2008) qui notait une modification de seulement 3 transcripts chez la variété résistante *V. aestivalis* et de 625 transcripts chez la variété sensible de *Vitis vinifera* en réponse à une attaque d'oïdium. Ces gènes codaient principalement pour des MAPKinases, des gènes WRKY, *PR1* et la stilbène synthase et suggère une induction des défenses basales chez les variétés sensibles, alors que chez les génotypes résistants celles-ci seraient constitutives.

En ce qui concerne les réponses à une attaque de mildiou, elles semblent différentes de celles obtenues en présence d'oïdium. La modification transcriptomique est plus importante chez les variétés résistants que chez les variétés sensibles. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de Polesani *et al.*, (2010) qui obtient une reprogrammation transcriptomique chez la variété résistante *V. riparia* plus intense que chez la variété sensible Cabernet Sauvignon en réponse à une attaque de mildiou. Force est de constater, que nous obtenons une plus forte sur-expression des gènes codant pour les PR protéines (*PR1* et *PR3* chez Rpv1 et *PR6* chez Rpv2) et de gènes codant pour des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes (*STS*, *LDOX*, *ANR* et *F3H* chez Rpv1 et *PAL* chez Rpv2) chez les variétés possédant des QTLs de résistance que chez les variétés sensibles.

Une infection de *P. viticola* se traduit dans les feuilles de vigne, généralement par de nombreuses répressions des gènes impliqués dans les défenses et quelques surexpressions (*CHS*, *LDOX*, *PAL*, *STS* et *PR1*). Ces résultats semblent refléter l'exploitation de ressources cellulaires de la plante, et/ou un possible effet suppresseur des mécanismes de défense du pathogène, comme suggéré par Polesani *et al.*, (2008) et Perazzolli *et al.*, (2008), et que nous avons mis en évidence dans la partie I.

Les données préliminaires présentées dans cette étude, confirment une fois de plus que le BTH induit une protection, des variétés sensibles, efficace contre des infections de *P. viticola* et d'*E. necator*, en induisant une résistance systémique acquise. Néanmoins, les résultats que nous obtenons sur l'effet inducteur du BTH sur des variétés partiellement ou totalement résistantes sont tout à fait novateurs et peuvent conduire à des applications d'intérêt dans le cadre du développement de méthodes alternatives.

▪ ***Comparaison des profils en polyphénols des différents génotypes après traitement avec le BTH selon la variabilité génétique des agents pathogènes***

Les analyses quantitatives des stilbènes majoritaires (picéide, resvératrol et ptérostilbène) dans les feuilles de vigne montrent des accumulations significativement différentes entre les différents génotypes et les modalités témoins.

Dans les feuilles non triatées et non inoculées (témoin), les quantités de stilbènes découvertes sont d'autant plus importantes que le génotype est résistant. De plus, chez les génotypes résistants nous notons une forte corrélation entre la surexpression des gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (surtout la *PAL* et la *STS*) et l'accumulation significative de composés biochimiques de type stilbenoïdes de manière constitutive.

Le resvératrol et le picéide semblent ne pas être impliqués directement dans la défense de la plante contre les agents pathogènes. En effet, nous notons des accumulations après infection (lors du développement des agents pathogène), sans réel effet sur le développement des pathogènes, dans les génotypes sensibles. En revanche, un dérivé, tel que le ptérostilbène, participerait potentiellement à une lutte efficace contre les agents pathogènes. Les quantités produites de ce composé sont directement corrélées à la résistance observée chez les génotypes. Toutefois, la protection conférée par une élicitation avec le BTH ne semble pas statistiquement corrélée avec la quantité de ptérostilbène chez le cultivar sensible Cabernet-Sauvignon. L'inhibition totale du développement de l'oïdium et du mildiou chez les variétés résistantes, pourrait, pour partie, résulter d'une production ou d'une réserve de ptérostilbène avant l'infection, lequel est considéré comme une des molécules la plus toxique vis-à-vis du mildiou (Pezet *et al.*, 2004 et Schnee *et al.*, 2008).

Les génotypes testés dans cette étude ont introgressés des QTLs fortement liés à des locus de gènes de résistance (RGA codant pour des récepteurs de type NBS-LRR) (Di Gaspero *et al.*, 1997 et Zyprian *et al.*, 2003). Dans la résistance mono-génique des systèmes de défenses gène-pour-gène, la production de phytoalexines y est fortement associée (Glazebrook *et al.*, 1997 ; Hammerschmidt, 1997) et il est possible de classer les niveaux de résistance des cépages par évaluation de leurs concentrations (les quantités de stilbènes sont directement proportionnelles au niveau de résistance des différents cépages, Gindro *et al.*, 2007). Les génotypes possédant le QTL Rpv2 (Rpv2 et Rpv1+2) sont les génotypes qui produisent le plus de stilbènes et corrobore le fait que le QTL Rpv2 est associé à une résistance mono-génique totale et qu'il s'agit d'un locus RGA. Les génotypes possédant le QTL Rpv1, présentent des quantités de stilbènes intermédiaires, confirmant qu'il est associé à une résistance partielle, probablement multi-génique.

Cette étude apporte des résultats originaux, sur la possibilité d'augmenter le niveau de résistance de génotypes partiellement résistants par élicitation jusqu'à l'obtention d'une résistance totale et pourrait participer à leur durabilité.

En termes de perspectives de ce travail, il conviendra d'exploiter la totalité des expériences réalisées afin d'assurer la significativité des données, d'analyser les profils d'expression de gènes potentiellement impliqués dans les défenses de la vigne contre l'oïdium, pour pouvoir confirmer ou infirmer les différences d'efficacité de stimulation des différents génotypes face à la diversité génétique d'*E. necator* et de *P. viticola*, en apportant ainsi des données inédites sur le comportement des génotypes. À partir des résultats et des conclusions qui émaneront de cette étude, nous pourrions évaluer l'efficacité des molécules étudiées au vignoble afin d'examiner le niveau de défense de la plante entière *in natura*, et mettre en place des stratégies de lutte alternative intégrant l'utilisation d'éliciteur et des variétés partiellement résistantes. Ainsi, ce travail combine-t-il la variabilité génétique de la plante et la réponse à une élicitation, et devrait contribuer à apporter des éléments de réponses significatifs et participer au développement de nouvelles méthodes de lutte visant à atteindre l'objectif du plan « ecophyto » de réduction des intrants pesticides.

La réalisation d'essais en conditions naturelles, identiques à ceux réalisés sur la variété sensible Cabernet-Sauvignon (cf. partie II) devrait nous éclairer sur l'intérêt d'associer ces

deux démarches dans le cadre d'une modification des pratiques viticoles pour une viticulture innovante et une protection durable.

Conclusions générales et perspectives

CONCLUSIONS GENERALES

L'oïdium et le mildiou de la vigne représentent les deux maladies les plus importantes de la vigne cultivée. En absence de protection phytosanitaire, ces maladies conduisent à une réduction de rendement qui peut aller jusqu'à une perte totale de récolte. À la suite du Grenelle de l'environnement, le plan "Ecophyto 2018", mis en place, vise à réduire de moitié l'utilisation des intrants phytosanitaires, tout en maintenant une production agricole de qualité. Il paraît donc nécessaire de modifier les pratiques agricoles et développer de nouvelles stratégies capables d'intégrer l'utilisation d'autres méthodes comme la lutte biologique, la sélection variétale ou la stimulation des défenses des plantes.

L'utilisation d'éliciteurs, pour induire les défenses des plantes, s'avère une méthode alternative et/ou complémentaire intéressante à explorer en termes d'efficacité. Envisager son utilisation sur des variétés sensibles ou partiellement résistantes aux maladies, permettrait de limiter potentiellement le contournement variétal, de diminuer fortement les intrants pesticides et de surcroît de limiter l'acquisition de la résistance aux fongicides d'agents pathogènes.

L'étude menée dans ce travail de thèse a permis d'analyser plus finement le comportement de la vigne face à une attaque de mildiou et d'oïdium, et ses réponses après une élicitation avec des produits potentiellement stimulateurs.

Ainsi, démontrons-nous que les pathogènes manipulent le métabolisme de la plante pour se développer, en réprimant de nombreux gènes, et confirment des travaux qui montraient que les agents pathogènes exploitaient les ressources cellulaires de la plante, et/ou exerçaient un possible effet suppresseur sur les mécanismes de défense par leur effecteurs (Polesani, *et al.*, 2008).

Nous montrons que les éliciteurs choisis (BTH et phosphonates) peuvent protéger efficacement la vigne contre le mildiou et l'oïdium en induisant une résistance systémique acquise, conduisant à une expression coordonnée de PR protéines et à la production de phytoalexines. Cependant, la vigne module ses défenses en sur-exprimant un ensemble de gènes de défense, dont l'expression varie selon la molécule utilisée (le BTH induit plus de modifications que les phosphonates), mais également en fonction de la diversité phénotypique et génétique des agents pathogènes contre lesquels elle se défend. Nous avons mis en évidence que pour les groupes génétiques d'*E. necator* ou pour les souches de *P. viticola* résistantes aux fongicides, les niveaux de sur-expression de certains gènes de défense semblent plus élevés et plus précoces. Nous notons également que certaines surexpressions sont directement corrélées au niveau de protection foliaire obtenu, et la vitesse à laquelle les gènes sont surexprimés semble plus importante que leur niveau de sur-expression. Les éliciteurs agissent également sur la vigne en limitant l'action négative des pathogènes et en induisant la sur-expression de gènes de défense et l'accumulation de phytoalexines les plus toxiques pour les pathogènes (ptérostilbène, viniférines et un composé de nature inconnue). En accord avec la littérature (Gindro *et al.*, 2007), nous confirmons que les stilbènes représentent bien des marqueurs de résistance (quantité directement proportionnelle au niveau de résistance dans les variétés résistantes), mais leur implication dans les mécanismes de défenses induites par élicitation dans la variété sensible Cabernet-Sauvignon semble limité. Il serait fort intéressant de chercher d'autres phytoalexines permettant de mieux expliquer la protection de la vigne obtenue par élicitation (comme isoflavonoïdes avec la catéchine et épicatechine), ou des dérivés indoliques, et identifier le composé inconnu détecté (temps de rétention = 24,9 min) dont l'accumulation semble corrélée avec la protection de la plante.

Le BTH et les phosphonates induisent une résistance systémique acquise par une sur-expression de gènes SA-dépendants (*PR1*, *PR2*, *PR4*, *PR5* et *PR10*) mais potentiellement,

aussi en empruntant la voie de l'acide jasmonique et de l'éthylène, suggérant que le dialogue moléculaire et le rôle des phytohormones soient plus complexes que ne le décrit la littérature. En effet, non seulement, nous obtenons la sur-expression de *PR3* et/ou *PR8* dans les réponses de défenses de la vigne identifiés comme des marqueurs de la voie de l'acide jasmonique, mais également une sur-expression de l'*ACC* codant pour la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase, impliquée dans la voie de biosynthèse de l'éthylène, après élicitation avec le BTH. De plus, des analyses protéomiques récentes ont montré une accumulation de l'*ACC* oxydase en réponse à l'élicitation du framboisier nain (*Rubus arctica*) avec le BTH (Hukkanen *et al.*, 2008).

Lors de l'induction des défenses après une élicitation avec le BTH, une reprogrammation du métabolisme se met en place avec la synthèse de métabolites secondaires *via* la voie oxydative des pentoses phosphate et des shikimates (Scheideler *et al.*, 2002 et Hu *et al.*, 2009), mais également un changement généralisé des fonctions de maintien ("housekeeping" ou métabolisme primaire) (De Nardi *et al.*, 2006). De plus, Pontin *et al.* (2010) observent une répression d'un nombre de gènes répondant à une signalisation transitant par l'AIA, lors de l'induction des défenses de la vigne par les UV-B, supportant l'idée qu'une répression du signal de l'auxine contribuerait à induire des réponses de défense de la plante.

Dans les réponses de défenses de la vigne induites par les trois éliciteurs contre le mildiou et l'oïdium, une forte modulation de l'expression des gènes *ANTS*, *CHORM* ou *CHORS*, impliqués dans la voie de biosynthèse d'alcaloïdes putatifs et de l'auxine est observée. Avec les stilbènes, les isoflavonoïdes, la lignine, les alcaloïdes et les dérivés indoles jouent un rôle important dans la résistance aux pathogènes (Hu *et al.*, 2009 et Beets et Dubery, 2011). Chez *A. thaliana*, l'induction de la synthèse de camalexine, un composé dérivé du métabolisme du tryptophane en réponse à une attaque de pathogène joue un rôle important dans les défenses qui impliquent des voies de signalisation dépendantes de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique ou de l'éthylène (Beets et Dubery, 2011). De plus, la chorismate synthase (*CHORS*), l'anthranilate synthase (*ANTS*), et la chorismate mutase (*CHORM*) sont des gènes différentiellement exprimés lors d'interactions compatibles et incompatibles de l'orge avec *B. graminis* f. sp. *hordei* (Hu *et al.*, 2009). En se basant sur ce modèle, nous suggérons que la vigne serait peut-être capable de moduler ses défenses et de produire d'autres phytoalexines. En effet, J. Bouscaut (2005), au cours de sa thèse, avait montré une accumulation significative d'un composé inconnu, dérivé du métabolisme du tryptophane (donc dérivé de la voie de l'auxine) lors d'une interaction incompatible avec *P. viticola*. L'exploration plus minutieuse de cette voie permettrait d'identifier de nouveaux marqueurs d'intérêt et de mieux comprendre les mécanismes de défenses de la vigne.

Les expérimentations "terrains" mises en place durant ces trois années, ont permis de montrer qu'il était possible de stimuler les défenses de la vigne pour protéger partiellement celle-ci contre le mildiou et l'oïdium y compris sous de très fortes pressions épidémiques. Contrairement à de nombreuses études réalisées sur le terrain qui n'ont pas donné de résultats satisfaisants, nous avons fait le choix d'utiliser une dose de BTH 3 fois plus forte que celles utilisées habituellement, basé sur les résultats obtenus *in vitro*. Force est de constater que dès la présentation de nos résultats préliminaires en 2007 à l'ICPP de Turin, de nombreuses modifications dans les protocoles expérimentaux de nos collègues sont apparues (Perrazolli *et al.*, 2008).

Les expérimentations terrains mises en place, malgré un grand nombre de traitements, montrent qu'il est possible d'utiliser les SDP, et que leur alternance ou leur association avec des fongicides mériteraient quelques investigations supplémentaires. En effet, nous avons obtenu contre toute attente des résultats très intéressants car en condition de très forte pression

parasitaire (rarement obtenue naturellement) des protections significatives ont été obtenues en associant l'utilisation de stimulateurs et de fongicides. Conformément à ce qui était attendu, les résultats sont très variables et fortement liés à la physiologie de la plante et aux conditions environnementales. L'efficacité d'éliciteur s'avère fortement dépendante de la dose appliquée, mais aussi des conditions climatiques plus ou moins favorables au développement de la maladie et au développement de la plante. Pour certains éliciteurs comme le BTH, il semble qu'il induise, outre la stimulation des défenses, des retards de croissance et ce quel que soit le millésime. Le stade phénologique de la vigne et les conditions environnementales lors des applications semblent avoir une incidence sur ces effets. Son efficacité induit néanmoins une réduction systématique du nombre des grappes et de leur taille indépendamment du taux de maladie, par rapport aux grappes traitées avec le fongicide.

Au cours de ces expérimentations, nous avons mis en évidence une sélectivité des produits en termes d'efficacité avec une protection différentielle au niveau des feuilles ou des grappes. Le BTH procure une protection significative des grappes en 2009, un effet délétère en 2010 et apporte une bonne protection des grappes en 2011. Le FOS, quant-à lui, plus efficace que le BTH sur feuilles en 2009, a très mal protégé les grappes.

De plus, les applications de BTH induit au vignoble une diminution significative de la charge en raisin. Cet effet pourrait résulter, soit d'une phytotoxicité dépendante de la dose appliquée, soit d'un coût énergétique important pour la plante lors de l'allocation des ressources pour sa défendre.

La transposition de la méthode, mise au point au laboratoire, sur des essais en conditions naturelles a permis d'aborder le comportement de la vigne face au mildiou et à l'oïdium après différents types de stimulation. Les cinétiques d'expression de gènes d'intérêt par q-RT-PCR et les analyses des polyphénols ont permis de confirmer la corrélation entre certains facteurs et un niveau de protection contre le mildiou et l'oïdium au vignoble en 2009. Ainsi, une surexpression des gènes codant pour une β , 1-3 glucanase (*PR2*) et des chitinases de classe III et IV (*PR3* ou *PR8*) semble corrélée avec le niveau de protection foliaire, et une sur-expression de la GST avec le niveau de protection des grappes. L'accumulation de ptérostilbène ou d'un composé inconnu décrit précédemment est corrélée avec le niveau de protection. Les analyses moléculaires et biochimiques des échantillons prélevés en 2010 et 2011 sont maintenant indispensables pour confirmer ces résultats préliminaires et valider la méthode.

L'utilisation de la méthode "BioMolChem" sur les variétés résistantes confirme l'intérêt de l'utilisation de ces marqueurs d'état de défense et pourrait s'avérer intéressante pour de nombreuses équipes qui cherchent à obtenir des marqueurs d'état de défense (Réseau INDRES). Cette dernière étude apporte des résultats originaux sur la possibilité d'augmenter le niveau de résistance de génotypes partiellement résistants par élicitation, jusqu'à l'obtention d'une résistance totale. Des pulvérisations à faible dose de BTH (100 mg/L) permettent de rendre une vigne partiellement résistante, totalement résistante au mildiou et à l'oïdium. Les analyses biochimiques montrent que les quantités des stilbènes sont d'autant plus importantes que le génotype est résistant en accord avec Little *et al.*, (2003). En effet, des dérivés du resvératrol, *e.g.* le ptérostilbène, interviendraient et participeraient potentiellement à une lutte efficace contre les agents pathogènes étudiés. En effet, les quantités de ce composé sont directement corrélées au niveau de résistance observé chez les génotypes le produisant. De plus, chez les génotypes résistants nous notons une forte corrélation entre la sur-expression des gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (surtout la *PAL* et la *STS*) et l'accumulation significative de composés de type stilbénoides de manière constitutive. En revanche, la protection conférée après

l'élicitation avec le BTH ne semble pas statistiquement corrélée avec la quantité de ptérostilbène dans le cas des génotypes résistants. Les résultats obtenus sur l'effet inducteur du BTH sur des variétés partiellement ou totalement résistantes sont tout à fait novateurs et pourraient conduire à des applications d'intérêt dans le cadre de méthodes alternatives.

PERSPECTIVES

Ce travail que nous avons réalisé en combinant la variabilité génétique de la plante et la réponse à une élicitation devrait contribuer à apporter des éléments de réponses significatifs et participer au développement de nouvelles méthodes de lutte visant à atteindre l'objectif du plan « Ecophyto 2018 » de réduction des intrants pesticides.

En terme de perspectives, il conviendra d'exploiter la totalité des échantillons obtenus afin d'assurer la significativité des données de terrain et sur les génotypes résistants, d'analyser les profils d'expression de gènes potentiellement impliqués dans les défenses de la vigne contre l'oïdium, pour confirmer ou infirmer les différences d'efficacité de stimulation des différents génotypes face à la diversité génétique d'*E. necator* et de *P. viticola*, apportant ainsi des données inédites sur le comportement des génotypes.

Grâce à la transcriptomique et le séquençage récent du génome de *Vitis vinifera*, il est possible de dessiner de nouvelles amorces pour augmenter le nombre de gènes candidats pour un suivi au niveau transcriptionnel. Ainsi, il nous sera possible d'explorer de nouvelles voies métaboliques et d'avoir une vision plus globale des effets d'éliciteurs. Actuellement, 30 nouvelles amorces ont été dessinées et sont actuellement testées dans le cadre d'un projet FUI Neoprotec, auquel je participerai courant 2012.

Si dans un premier temps, nous nous sommes intéressés principalement aux stilbènes, il est indispensable d'étudier l'importance des flavonoïdes (catéchine, épicatechine et dérivés), connus comme possédant également de nombreuses activités biologiques et les dérivés indoles afin d'identifier un composé potentiellement équivalent à la camalexine chez *A. thaliana* et d'évaluer son importance dans les réactions de défense.

La méthode « BioMolChem » mise au point sera fort utile pour les projets de recherches initiés au laboratoire, et les programmes de deux FUIs (DEFISTIM et NEOPROTEC).

À ce jour, il est possible d'évaluer l'efficacité de molécules étudiées au vignoble et d'examiner le statut de défense de vigne *in natura*. Ainsi, la mise en place de stratégies de lutte alternative intégrant l'utilisation d'éliciteur et de variétés partiellement résistantes pourrait-elle être menée à bien. Une parcelle expérimentale de variétés de vigne partiellement résistantes a été plantée sur le site de la Grande Ferrade à Bordeaux. La mise en œuvre d'expérimentations d'élicitation sur ces génotypes *in natura* semble être une approche des plus intéressantes. En effet, si les SDP semblent potentiellement intéressants, appliqués seuls au vignoble, ils n'apporteront pas de résultats constants et stables, et seront peu acceptés par la profession. C'est pourquoi, outre l'intérêt des SDP sur des variétés partiellement résistantes, nous poursuivrons des essais sur différents cépages bordelais, car il sera indispensable de raisonner les traitements avec ces produits et de les associer éventuellement à des molécules fongicides à doses réduites. De plus, les connaissances sur les défenses de la vigne en fonction des organes et des stades de sensibilité (floraison, nouaison) sont pauvres, voire inexistantes et nous avons commencé à étudier ces points, sans lesquels une utilisation rationnelle des SDP risque d'être voué à l'échec. L'utilisation des marqueurs de défense retenus comme indicateurs sera nécessaire pour valider le statut de défense de la plante, et la prise de décision pour l'application de traitements fongicides.

Les essais avec les SDP réalisés depuis plus de vingt ans sur vigne, ont rarement permis de comprendre pourquoi leurs efficacités étaient si décevantes. Avec les outils développés dans ce travail et les résultats obtenus, nous avons bons espoirs de mieux comprendre et de mieux exploiter le potentiel de ce type de lutte.

Références bibliographiques

- Adrian, M.; Jeandet, P.; Veneau, J.; Weston, L. A.; Bessis, R. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology* (1997), 23: 1689-1702
- Akkurt, M.; Welter, L.; Maul, E.; Toepfer, R.; Zyprian, E. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). *Molecular Breeding* (2007), 19: 103-111
- Amrani, L.; Corio-Costet, M. F. A single nucleotide polymorphism in the beta -tubulin gene distinguishing two genotypes of *Erysiphe necator* expressing different symptoms on grapevine. *Plant Pathology* (2006), 55: 505-512
- Ali, G. S.; Harman, G. E.; Reisch, B. I. The interaction of endochitinase, a synthetic peptide and resveratrol in controlling fungi in vitro. *European Journal of Plant Pathology* (2003), 109: 639-644
- Andreu, A. B.; Guevara, M. G.; Wolski, E. A.; Daleol, G. R.; Caldiz, D. O. Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. *Pest Management Science* (2006), 62: 162-170
- Aziz, A.; Gauthier, A.; Bezier, A.; Poinssot, B.; Joubert, J. M.; Pugin, A.; Heyraud, A.; Baillieul, F. Elicitor and resistance-inducing activities of beta -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with beta -1,3 glucans and alpha -1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany* (2007), 58: 1463-1472
- Aziz, A.; Poinssot, B.; Daire, X.; Adrian, M.; Bezier, A.; Lambert, B.; Joubert, J. M.; Pugin, A. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (2003), 16: 1118-1128
- Babu, R. M.; Sajeena, A.; Samundeeswari, A. V.; Sreedhar, A.; Vidhyasekeran, P.; Reddy, M. S. Induction of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) resistance in rice by treatment with acibenzolar-S-methyl. *Annals of Applied Biology* (2003), 143: 333-340
- Bai, W.; Chern, M.; Ruan, D.; Canlas, P. E.; Sze-to, W. H.; Ronald, P. C. Enhanced disease resistance and hypersensitivity to BTH by introduction of an NH1/OsNPR1 paralog. *Plant Biotechnology Journal* (2011), 9: 205-215
- Bardin, M.; Fargues, J.; Nicot, P. C. Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. *Biological Control* (2008), 46: 476-483
- Barilli, E.; Prats, E.; Rubiales, D. Benzothiadiazole and BABA improve resistance to *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in *Pisum sativum* L. with an enhancement of enzymatic activities and total phenolic content. *European Journal of Plant Pathology* (2010), 128: 483-493
- Barilli, E.; Sillero, J. C.; Rubiales, D. Induction of Systemic Acquired Resistance in Pea against Rust (*Uromyces pisi*) by Exogenous Application of Biotic and Abiotic Inducers. *Journal of Phytopathology* (2009), 158: 30-34

Baudoin, A. ; Olaya, A.G. ; Delmotte, F. ; Colcol, .F ; Sierotski, H. QoI resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the Mid-Atlantic United states. *Plant management Network, Plant health progress* (2008) DOI: 10.1094/PHP-2008-0211-02-RS

Baysal O, Soylyu EM, Soylyu S, 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathology* **52**, 747-753.

Beets, C.; Dubery, I. Quantification of camalexin, a phytoalexin from *Arabidopsis thaliana*: A comparison of five analytical methods. *Analytical biochemistry* (2011), 419: 260-265

Beets, C.; Dubery, I. Quantification of camalexin, a phytoalexin from *Arabidopsis thaliana*: A comparison of five analytical methods. *Analytical biochemistry* (2011), 419: 260-265

Bellin, D.; Peressotti, E.; Merdinoglu, D.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Adam-Blondon, A. F.; Cipriani, G.; Morgante, M.; Testolin, R.; Di Gaspero, G. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theoretical and Applied Genetics* (2009), 120: 163-176

Benhamou, N.; Belanger, R. R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. *Plant Physiology* (1998), 118: 1203-1212

Bengtsson, M.; Wulff, E.; Jorgensen, H. J. L.; Pham, A.; Lubeck, M.; Hockenhull, J. Comparative studies on the effects of a yucca extract and acibenzolar-S-methyl (ASM) on inhibition of *Venturia inaequalis* in apple leaves. *European Journal of Plant Pathology* (2009), 124: 187-198

Belhadj, A.; Saigne, C.; Telef, N.; Cluzet, S.; Bouscaut, J.; Corio-Costet, M. F.; Merillon, J. M. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006), 54: 9119-9125

Belhadj, A.; Telef, N.; Saigne, C.; Cluzet, S.; Barrieu, F.; Hamdi, S.; Merillon, J. M. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* (2008), 46: 493-499

Belhadj, A.; Telef, N.; Cluzet, S.; Bouscaut, J.; Corio-Costet, M. F.; Merillon, J. M. Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2008)b, 56: 5781-5787

Bent, A. F.; Mackey, D. Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology* (2007) 45: 399-436

Blasi, P.; Blanc, S.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Prado, E.; Ruehl, E. H.; Mestre, P.; Merdinoglu, D. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical and Applied Genetics* (2011), 123: 43-53

Bleecker, A. B.; Kende, H. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (2000), 16: 1-18

- Blum, M.; Boehler, M.; Randall, E.; Young, V.; Csukai, M.; Kraus, S.; Moulin, F.; Scalliet, G.; Avrova, A. O.; Whisson, S. C.; Fonne-Pfister, R. Mandipropamid targets the cellulose synthase-like PiCesA3 to inhibit cell wall biosynthesis in the oomycete plant pathogen, *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* (2010), 11: 227-243
- Boava, L. P.; Laia, M. L.; Jacob, T. R.; Dabbas, K. M.; Goncalves, J. F.; Ferro, J. A.; Ferro, M. I.; Furtado, E. L. Selection of endogenous genes for gene expression studies in *Eucalyptus* under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR. *BMC research notes* (2010), 3: 43
- Bokshi, A. I.; Morris, S. C.; Deverall, B. J. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on beta-1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. *Plant Pathology* (2003), 52: 22-27
- Bompeix, G.; Fettouche, F.; Saindrenan, P. Mode of action of phosethyl Al. *Phytiatrie-Phytopharmacie* (1981), 30: 257-272
- Bompeix, G.; Saindrenan, P. *In vitro* antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid on *phytophthora* species. *Fruits* (1984) 39: 777-786.
- Bouquet, A. Introduction dans l'espèce *Vitis vinifera* L. d'un caractère de résistance à l'o (*Uncinula necator* Schw. Burr.) issu de l'espèce *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. *Vignevini* (1986), 12 (suppl):141-146
- Bouquet, A.; Danglot, Y. Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Vitis* (1996), 35: 35-42
- Bouscaut, J.; Corio-Costet, M. F. Detection of a specific transposon in *Erysiphe necator* from grapevines in France. *Journal of Phytopathology* (2007), 155: 381-383
- Bouscaut, J. Diversité de defenses induites de la vigne et efficacité sur le mildiou et l'oïdium. Thèse pour le Doctorat de l'université de Bordeaux 2, (2005), 209 pages
- Bovie, C. O. M. ; Thonart, P. ; Dommes, J. Cloning and expression analysis of cDNAs corresponding to genes activated in cucumber showing systemic acquired resistance after BTH treatment. *BMC Plant Biology* (2004), 26: 4-15.
- Bressan, A.; Purcell, A. H. Effect of benzothiadiazole on transmission of X-disease phytoplasma by the vector *Colladonus montanus* to *Arabidopsis thaliana*, a new experimental host plant. *Plant Disease* (2005), 89: 1121-1124
- Brewer, MT.; Milgroom, MG. Phylogeography and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, from diverse *Vitis* species. (2010) *BMC Evolution Biology* 10: 268.
- Brewer, MT.; Cadle-Davidson, L.; Cortesi, P.; Spanu, P. D.; Milgroom, MG. Identification and structure of the mating-type locus and development of PCR-based markers for mating type in powdery mildew fungi. (2011) *Fungal Genetic Biology* 10: 268.

Brisset, M. N.; Cesbron, S.; Thomson, S. V.; Paulin, J. P. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* (2000), 106: 529-536

Busam, G.; Junghanns, K. T.; Kneusel, R. E.; Kassemeyer, H. H.; Matern, U. Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme a 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiology* (1997), 115: 1039-1048

Buzi, A.; Chilosi, G.; Magro, P. Induction of resistance in melon seedlings against soil-borne fungal pathogens by gaseous treatments with methyl jasmonate and ethylene. *Journal of Phytopathology* (2004), 152: 491-497

Buzi, A.; Chilosi, G.; Sillo, D. d.; Magro, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *Journal of Phytopathology* (2004), 152: 34-42

Calonnec, A.; Cartolaro, P.; Poupot, C.; Dubourdieu, D.; Darriet, P. Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. *Plant Pathology* (2004)53: 434-445

Campbell, P. A.; Latorre, B. A. Suppression of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*) by acibenzolar-S-methyl. *Vitis* (2004), 43 :209-210

Canet, J. V.; Dobon, A.; Ibanez, F.; Perales, L.; Tornero, P. Resistance and biomass in *Arabidopsis*: a new model for Salicylic Acid perception. *Plant Biotechnology Journal* (2010), 8: 126-141

Canet, J. V.; Dobon, A.; Roig, A.; Tornero, P. Structure-function analysis of npr1 alleles in *Arabidopsis* reveals a role for its paralogs in the perception of salicylic acid. *Plant Cell and Environment* (2010), 33: 1911-1922

Cao, S.; Hu, Z.; Zheng, Y.; Yang, Z.; Lu, B. Effect of BTH on antioxidant enzymes, radical-scavenging activity and decay in strawberry fruit. *Food Chemistry* (2011)a, 125: 145-149

Cao, S.; Yang, Z.; Hu, Z.; Zheng, Y. The effects of the combination of *Pichia membranefaciens* and BTH on controlling of blue mould decay caused by *Penicillium expansum* in peach fruit. *Food Chemistry* (2011)b, 124: 991-996

Cavalcanti, F. R.; Resende, M. L. V.; Ribeiro Junior, P. M.; Pereira, R. B.; Oliveira, J. T. A. Induction of resistance against *Verticillium dahliae* in cacao by a *Crinipellis pernicioso* suspension. *Journal of Plant Pathology* (2008), 90: 273-280

Chen, H.; Seguin, P.; Jabaji, S. H. Differential expression of genes encoding the phenylpropanoid pathway upon infection of soybean seedlings by *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* (2009), 31: 356-367

Chen, J.; Zhang, W. D.; Song, F. M.; Zheng, Z. Phospholipase C/diacylglycerol kinase-mediated signalling is required for benzothiadiazole-induced oxidative burst and hypersensitive cell death in rice suspension-cultured cells. *Protoplasma* (2007), 230: 13-21

Chen, W. J.; Delmotte, F.; Richard-Cervera, S.; Douence, L.; Greif, C.; Corio-Costet, M. F. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied and Environmental Microbiology* (2007), 73: 5162-5172

Cheong, Y. H.; Chang, H. S.; Gupta, R.; Wang, X.; Zhu, T.; Luan, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* (2002), 129: 661-677

Civolani, S.; Marchetti, E.; Chicca, M.; Castaldelli, G.; Rossi, R.; Pasqualini, E.; Dindo, M. L.; Baronio, P.; Leis, M. Probing behaviour of *Myzus persicae* on tomato plants containing Mi gene or BTH-treated evaluated by electrical penetration graph. *Bulletin of Insectology* (2010), 63: 265-271

Clarke, J. D.; Volko, S. M.; Ledford, H.; Ausubel, F. M.; Dong, X. N. Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* (2000), 12: 2175-2190

Cluzet, S.; Torregrosa, C.; Jacquet, C.; Lafitte, C.; Fournier, J.; Mercier, L.; Salamagne, S.; Briand, X.; Esquerre-Tugaye, M. T.; Dumas, B. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. *Plant Cell and Environment* (2004), 27: 917-928

Cohen, Y.; Rubin, A. E.; Kilfin, G. Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL-beta-amino-butyric acid (BABA). *European Journal of Plant Pathology* (2010), 126: 553-573

Coleman, C.; Copetti, D.; Cipriani, G.; Hoffmann, S.; Kozma, P.; Kovacs, L.; Morgante, M.; Testolin, R.; Di Gaspero, G. The powdery mildew resistance gene REN1 co-segregates with an NBS-LRR gene cluster in two Central Asian grapevines. *BMC Genetics* (2010), 10: 147-158

Conrath, U.; Thulke, O.; Katz, V.; Schwindling, S.; Kohler, A. Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology* (2001), 107: 113-119

Cooper, W. C.; Jia, L.; Goggin, F. L. Acquired and R-gene-mediated resistance against the potato aphid in tomato. *Journal of Chemical Ecology* (2004), 30: 2527-2542

Corio-Costet, M. F. ; Delmotte, F. ; Martinez, F. ; Giresse, X. ; Raynal, M. ; Richart-Cervera, S. ; Douence, L. ; Panon, M.L. ; Chen, W.J. Resistance aux Qois du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) : origine et diversité. 8th Int. Conf on Pest and Diseases, AFPP, Tours, 5-6 décembre, France). (2006) pp 612-620 CD-Rom.

Corio-Costet, M. F. (ed) *Erysiphe necator*. Tec/Doc Lavoisier, Paris, (2007)

Corio-Costet, M. F. ; Martinez, F. ; Delmotte, F. ; Douence, L. ; Richart-Cervera, S. ; Chen, W.-J.. Resistance of *Plasmopara viticola* to QoI fungicides: Origin and Diversity. In: Dehne, H.W, Gisi, U., Kuck, K.H., Russell, P.E. and Lyr H (ed.), *Modern fungicides and Antifungal compounds V*, DPG Selbstverlag, Braunschweig, (2008) pp. 107-112.

- Corio-Costet, M. F.; Dufour, M. C.; Cigna, J.; Abadie, P.; Chen, W. J. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* (2011), 129: 315-329
- Corio-Costet MF Fungicide resistance in *Plasmopara viticola* in France and anti resistance measures. CAB international 2012. In: Fungicide Resistance in crop protection : Risk and management (ed. TS Thind), 157-171. (2012) Sous presse.
- Corrado, G.; Agrelli, D.; Rocco, M.; Basile, B.; Marra, M.; Rao, R. Systemin-inducible defence against pests is costly in tomato. *Biologia Plantarum* (2011), 55: 305-311
- Cortes-Barco, A. M.; Goodwin, P. H.; Hsiang, T. Comparison of induced resistance activated by benzothiadiazole, (2R,3R)-butanediol and an isoparaffin mixture against anthracnose of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Pathology* (2010), 59: 643-653
- Cortesi, P.; Ottaviani, M. P.; Milgroom, M. G. Spatial and genetic analysis of a flag shoot subpopulation of *Erysiphe necator* in Italy. *Phytopathology* (2004), 94: 544-550
- Dai, G. H.; Andary, C.; Mondolotcosson, L.; Boubals, D. Involvement of Phenolic-Compounds in the Resistance of Grapevine Callus to Downy Mildew (*Plasmopara viticola*). *European Journal of Plant Pathology* (1995), 101: 541-547
- Dai, C.; Zhu, Z.; An, C.; Chen, N. Powdery mildew-resistant enzyme activities induced with BTH in melon seedlings. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* (2010), 26: 286-291
- D'Amelio, R.; Marzachi, C.; Bosco, D. Activity of benzothiadiazole on *chrysanthemum yellows phytoplasma* ('*Candidatus Phytoplasma asteris*') infection in daisy plants. *Crop Protection* (2010), 29: 1094-1099
- Dalbo, M. A.; Ye, G. N.; Weeden, N. F.; Wilcox, W. F.; Reisch, B. I. Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* (2001), 126: 83-89
- Daniel, R. ; Wilson, B. A. ; Cahill, D. M. Potassium phosphonate alters the defence response of *Xanthorrhoea australis* following infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* (2005), 34: 541-548.
- Daniel, R.; Guest, D. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2006), 67: 194-201
- Dangl, J. L.; Jones, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature (London)* (2001), 411: 826-833
- Dann, E.; Diers, B.; Byrum, J.; Hammerschmidt, R. Effect of treating soybean with 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in field and greenhouse studies. *European Journal of Plant Pathology* (1998), 104: 271-278

- Dao, H. T. T.; Puig, R. C.; Kim, H. K.; Erkelens, C.; Lefeber, A. W. M.; Linthorst, H. J. M.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. Effect of benzothiadiazole on the metabolome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* (2009), 47: 146-152
- Delledonne, M.; Xia, Y.; Dixon, R. A.; Lamb, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature (London)* (1998), 394: 585-588
- Delmotte, F.; Chen W-J.; Richard-Cervera, S.; Greif, C.; Papura, D., Giresse, X.; Mondor-Genson, G.; Corio-Costet, M-F.. Microsatellite loci from the grape downy mildew (*Plasmopara viticola*), *Molecular Ecology Notes*, (2006) 6: 379-381
- Delye, C.; Laigret, F.; Corio-Costet, M. F. RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. *Phytopathology* (1997)a, 87: 670-677
- Délye, C.; Laigret, F.; Corio-Costet, M-F. A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied Environmental Microbiology* (1997)b 63: 2966-2970
- Delye, C.; Corio-Costet, M. F. Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator* : RAPD analysis discriminates two biotypes. *Mycological Research* (1998), 102: 283-288
- Dercks, W.; Creasy, L. L. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara-viticola* grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1989), 34: 189-202
- De Nardi, B.; Dreos, R.; Del Terra, L.; Martellossi, C.; Asquini, E.; Tornincasa, P.; Gasperini, D.; Pacchioni, B.; Raihinavelu, R.; Pallavicini, A.; Graziosi, G. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. *Genome* (2006), 49: 1594-1605
- Di Gaspero, G.; Cipriani, G.; Adam-Blondon, A. F.; Testolin, R. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. *Theoretical and Applied Genetics* (2007), 114: 1249-1263
- Dong, X. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* (1998), 1: 316-323
- Dubos, B. Maladies cryptogamiques de la vigne. Bordeaux : Ed Féret 2002. (2002), 174 pages
- Durand, M. C.; Salle, G. Effect of aluminium tris-O-ethyl phosphonate on the pair *Lycopersicum esculentum* Mill.-*Phytophthora capsici* Leon. Cytological and cytochemical study. *Agronomie* (1981), 1: 723-732
- Dry, I. B.; Feechan, A.; Anderson, C.; Jermakow, A. M.; Bouquet, A.; Adam-Blondon, A. F.; Thomas, M. R. Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevines to powdery mildew. *Australian Journal of Grape and Wine Research* (2010), 16: 94-105

Dufour, M.-C.; Fontaine, S.; Montarry, J.; Corio-Costet, M.-F. Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Management Science* (2011), 67: 60-69

Eibach, R.; Zyprian, E.; Welter, L.; Toepfer, R. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* (2007), 46: 120-124

Eibach, R.; Diehl, H.; Alleweldt, G. Investigations on the heritability of resistance to *Oidium-tuckeri*, *Plasmopara-viticola* and *Botrytis-cinerea* in grapes. *Vitis* (1989), 28: 209-228

El Oirdi, M.; Abd El Rahman, T.; Rigano, L.; El Hadrami, A.; Cecilia Rodriguez, M.; Daayf, F.; Vojnov, A.; Bouarab, K. *Botrytis cinerea* Manipulates the Antagonistic Effects between Immune Pathways to Promote Disease Development in Tomato. *Plant Cell* (2011), 23: 2405-2421

English-Loeb, G.; Norton, A. P.; Gadoury, D.; Seem, R.; Wilcox, W. Biological control of grape powdery mildew using mycophagous mites. *Plant Disease* (2007), 91: 421-429

Evans, K.J.; Whisson, D.L.; Stummer, B.E. ; Scott, E.S. DNA markers identify variation in Australian populations of *Uncinula necator*. *Mycol Res* (1997) 101: 923-932

Expertise collective INRA-CEMAGREF. Pesticides, agriculture et environnement : réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Rapport de l'expertise collective réalisée par l'Inra et le Cemagref à la demande du ministère de l'Agriculture et de la Pêche et du ministère de l'Écologie et du Développement durable.

Falcon-Rodriguez, A. B.; Cabrera, J. C.; Ortega, E.; Martinez-Tellez, M. A. Concentration and physicochemical properties of chitosan derivatives determine the induction of defense responses in roots and leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* (2009), 4: 192-200

Falk, S.P.; Gadoury, D.M.; Pearson, R.C.; Seem, R.C. Partial control of grape powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Plant Dis.* 79, (1995), pp. 483-490.

Faessel, L.; Nassr, N.; Lebeau, T.; Walter, B. Chemically-induced resistance on soybean inhibits nodulation and mycorrhization. *Plant and Soil* (2010), 329: 259-268

Faoro, F.; Maffi, D.; Cantu, D.; Iriti, M. Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: the effects of chitosan and benzothiadiazole. *Biocontrol* (2008), 53: 387-401

Faurie, B.; Cluzet, S.; Corio-Costet, M. F.; Merillon, J. M. Methyl Jasmonate/Ethephon Cotreatment Synergistically Induces Stilbene Production in *Vitis Vinifera* Cell Suspensions but Fails to Trigger Resistance to *Erysiphe Necator*. *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin* (2009), 43: 99-110

Feng, J.-X.; Cao, L.; Li, J.; Duan, C.-J.; Luo, X.-M.; Le, N.; Wei, H.; Liang, S.; Chu, C.; Pan, Q.; Tang, J.-L. Involvement of OsNPR1/NH1 in rice basal resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *European Journal of Plant Pathology* (2011), 131: 221-235

Fenn, M. E.; Coffey, M. D. Further evidence of the direct mode of action of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology* (1985), 75: 601-611

Fenn, M. E.; Coffey, M. D. Quantification of Phosphonate and Ethyl Phosphonate in Tobacco and Tomato Tissues and Significance for the Mode of Action of 2 Phosphonate Fungicides. *Phytopathology* (1989), 79: 76-82

Fischer, B. M.; Salakhutdinov, I.; Akkurt, M.; Eibach, R.; Edwards, K. J.; Topfer, R.; Zyprian, E. M. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* (2004), 108: 501-515

Fischer, M. J. C.; Farine, S.; Chong, J.; Guerlain, P.; Bertsch, C. The direct toxicity of BABA against grapevine ecosystem organisms. *Crop Protection* (2009), 28: 710-712

Fisher, D.J. and Hayes, A.L. Mode of action of the systemic fungicides furalaxyl, metalaxyl and ofurace. *Pesticide Science* (1979), 13: 330-339.

Fofana, B.; McNally, D. J.; Labbe, C.; Boulanger, R.; Benhamou, N.; Seguin, A.; Belanger, R. R. Milsana-induced resistance in powdery mildew-infected cucumber plants correlates with the induction of chalcone synthase and chalcone isomerase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2002), 61: 121-132

Frenkel, O.; Brewer, M. T.; Milgroom, M. G. Variation in Pathogenicity and Aggressiveness of *Erysiphe necator* from Different *Vitis* spp. and Geographic Origins in the Eastern United States. *Phytopathology* (2010), 100: 1185-1193

Friedrich, L.; Lawton, K.; Ruess, W.; Masner, P.; Specker, N.; Gut Rella, M.; Meier, B.; Dincher, S.; Staub, T.; Uknes, S.; Métraux, J. P.; Kessmann, H.; Ryals, J. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Journal* (1996), 10: 61-70

Fung, R. W. M.; Gonzalo, M.; Fekete, C.; Kovacs, L. G.; He, Y.; Marsh, E.; McIntyre, L. M.; Schachtman, D. P.; Qiu, W. P. Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiology* (2008), 146: 236-249

Gadoury, D. M.; Seem, R. C.; Ficke, A.; Wilcox, W. F. Ontogenic resistance to powdery mildew in grape berries. *Phytopathology* (2003), 93: 547-555

Gadoury, D.M.; Cadle-Davidson, L.; Wilcox, W.F.; Dry, I.B.; Seem, R.C.; Milgroom, M.G. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology* (2011), DOI: 10.1111/J.1364-3703.2011.00728.X

Galet, P. Le mildiou de la vigne, *Les maladies et les parasites de la vigne*, Galet (Ed), Paysan du midi, Montpellier, France, (1977), 1: 89-222.

Galet, P. Vines and vineyards of France. Vol. 1. The American vines, (1988), 553 pages.

Galet, P. Précis en viticulture. Ed JF Impression, Saint-Jean de Védas (2000), 935 pages.

Garcia-Pineda, E.; Lozoya-Gloria, E. Induced gene expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC oxidase) in pepper (*Capsicum annuum* L.) by arachidonic acid. *Plant Science* (1999), 145: 11-21

Garcia-Pineda, E.; Castro-Mercado, E.; Lozoya-Gloria, E. Gene expression and enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.) ascorbate oxidase during elicitor and wounding stress. *Plant Science* (2004), 166: 237-243

Garcion, C.; Lamotte, O.; Métraux, J. P. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: Walters, D.; Newton, A.; Lyon, G. (eds) Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. Backwell publishing, Oxford, UK, (2007), pp 109-132

Gianinazzi, S.; Martin, C.; Vallee, J. C. Hypersensitivity to viruses, temperature and soluble proteins in *Nicotiana Xanthi* n.c. Appearance of new macromolecules at the repression of viral synthesis. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles* (1970), 270: 2383-2386

Giannakis, C.; Bucheli, C. S.; Skene, K. G. M.; Robinson, S. P.; Scott, N. S. Chitinase and b 1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection. *Australian Journal of Grape and Wine Research* (1998), 4: 14-22

Gindro, K.; Pezet, R.; Viret, O. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology and Biochemistry* (2003), 41: 846-853

Gindro, K.; Viret, O.; Spring, J. L. Development of methods to determine level of resistance to *Plasmopara viticola* for early selection in grapevine cultivars. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* (2007)a, 39: 133-139

Gindro, K.; Godard, S.; Groote, I. d.; Viret, O.; Forrer, H. R.; Dornart, B.; de Groote, I. Is it possible to induce grapevine defence mechanisms? A new method to evaluate the potential of elicitors. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* (2007)b, 39: 377-383

Gisi, U.; Waldner, M.; Kraus, N.; Dubuis, P.H.; Sierotski, H. Inheritance of resistance to carboxylic acid amide (CAA) fungicides in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* (2007) 56: 199-208.

Gisi, U. Chemical control of downy mildew. In: Spencer-Phillips, P.T.N. Gisi, U. and Lebeda, A. (ed.) *Advances in Downy Mildew Research*. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, Netherland, (2002) pp.119-159.

Gessler, C.; Pertot, I.; Perazzolli, M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea* (2011), 50: 3-44

Glazebrook, J.; Rogers, E. E.; Ausubel, F. M. Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* (1996), 143: 973-982

Gobbin, D.; Rumbou, A.; Linde, C. C.; Gessler, C. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards. *Molecular Plant Pathology*, (2006), 7: 519–531.

Gondim, D. M. F.; Terao, D.; Martins-Miranda, A. S.; Vasconcelos, I. M.; Oliveira, J. T. A. Benzo-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester does not protect melon fruits against *Fusarium pallidoroseum* infection but induces defence responses in melon seedlings. *Journal of Phytopathology* (2008), 156: 607-614

Görlach, J.; Volrath, S.; Knauf-Beiter, G.; Hengy, G.; Beckhove, U.; Kogel, K. H.; Oostendorp, M.; Staub, T.; Ward, E.; Kessmann, H.; Ryals, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* (1996), 8: 629-643

Grasso, V.; Palermo, S.; Sierotzki, H.; Garibaldi, A.; Gisi, U. Cytochrome b structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science* (2002). 62, 465-472

Guest, D. I. Modification of defence responses in tobacco and capsicum following treatment with fosetyl-Al aluminium tris (o-ethyl phosphonate). *Physiological Plant Pathology* (1984), 25: 125-134

Guest D.I. Evidence from Light-Microscopy of Living Tissues That Fosetyl-Al Modifies the Defense Response in Tobacco Seedlings Following Inoculation by *Phytophthora-Nicotianae* Var *Nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. (1986) 29: 251-261.

Guest, D. I.; Upton, J. C. R.; Rowan, K. S. Fosetyl-Al Alters the Respiratory Response in *Phytophthora-Nicotianae* Var *Nicotianae*-Infected Tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1989), 34: 257-265

Guest, D. I.; Grant, B. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* (1991), 66: 159-187.

Hajjeh, H.; Miazzi, M.; De Guido, M.A. ; Faretra, F. Specific scar primers for the ‘flag shoot’ and ‘ascospore’ biotypes of the grape powdery mildew fungus *Erysiphe necator*. *J. Plant Pathol.* (2005) 87, 71–74.

Hammerschmidt, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1999), 55

Hardy, G. E. S. ; Barrett, S. ; Shearer, B. L. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology* (2001), 30: 133-139.

Helson, B.; Groot, P. d.; McFarlane, J.; Zylstra, B.; Scarr, T.; de Groot, P. Leader and systemic applications of neem EC formulations for control of white pine weevil (Coleoptera: Curculionidae) on jack pine and white pine. *Proceedings of the Entomological Society of Ontario* (1998), 129: 107-113

Herman, M. A. B.; Davidson, J. K.; Smart, C. D. Induction of Plant Defense Gene Expression by Plant Activators and *Pseudomonas syringae* pv. tomato in Greenhouse-Grown Tomatoes. *Phytopathology* (2008), 98: 1226-1232

Hindumathy, C. K.; Shailasree, S.; Kini, K. R.; Shetty, H. S. Spore cell wall components of *Aspergillus niger* elicit Downy mildew disease resistance in pearl millet. *Phytoparasitica* (2006), 34: 72-86

Hoffman, L. E.; Wilcox, W. F.; Gadoury, D. A.; Seem, R. C. Influence of grape berry age on susceptibility to *Guignardia bidwelli* and its incubation period length. *Phytopathology* (2002), 92: 1068-1076

Hoffmann, L. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinatate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). (2003) Thèse de l'université Louis Pasteur-Strasbourg I.

Hren, M.; Nikolic, P.; Rotter, A.; Blejec, A.; Terrier, N.; Ravnikar, M.; Dermastia, M.; Gruden, K. 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *Bmc Genomics* (2009), 10: Article Number: 460, DOI: 10.1186/1471-2164-10-460

Hu, P. S.; Meng, Y.; Wise, R. P. Functional Contribution of Chorismate Synthase, Anthranilate Synthase, and Chorismate Mutase to Penetration Resistance in Barley-Powdery Mildew Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (2009), 22: 311-320

Huang, Y. J.; Hood, J. R.; Eckert, M. R.; Stonard, J. F.; Cools, H. J.; King, G. J.; Rossall, S.; Ashworth, M.; Fitt, B. D. L. Effects of fungicide on growth of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* in relation to development of phoma stem canker on oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathology* (2011), 60: 607-620

Huetz de Lempis, A. Boissons et civilisations en Afrique. Presses universitaires de Bordeaux, Pessac, (2001), pp-283-284.

Hui, D.; Iqbal, J.; Lehmann, K.; Gase, K.; Saluz, H. P.; Baldwin, I. T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuate* : V. Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiology* (2003), 131: 1877-1893

Hukkanen, A.; Kokko, H.; Buchala, A.; Hayrinen, J.; Karenlampi, S. Benzothiadiazole affects the leaf proteome in arctic bramble (*Rubus arcticus*). *Molecular Plant Pathology* (2008), 9: 799-808

Iriti, M.; Faoro, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendicalatus*. *Journal of phytopathology* (2004), 151: 171-180

Iriti, M.; Rossoni, M.; Borgo, M.; Faoro, F. Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2004), 52: 4406-4413

Iriti, M.; Rossoni, M.; Borgo, M.; Ferrara, L.; Faoro, F. Induction of resistance to gray mold with benzothiadiazole modifies amino acid profile and increases proanthocyanidins in grape: Primary versus secondary metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2005), 53: 9133-9139

Iriti, M.; Sironi, M.; Gomarasca, S.; Casazza, A.P.; Soave, C. ; Faoro, F. Cell death-mediated antiviral effect of chitosan in tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry* (2006), 4: 893–900.

Iriti, M. ; Faoro, F. Abscisic is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiology and Biochemistry* (2008) 46 :1106–1111.

Iriti, M.; Vitalini, S.; Di Tommaso, G.; D'Amico, S.; Borgo, M.; Faoro, F. New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* (2011), 17: 263-269

Jackson, T. J. ; Burgess, T. ; Colquhoun, I. ; Hardy, G. E. S. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* (2000), 49: 147-154.

Jacobs, A. K.; Dry, I. B.; Robinson, S. P. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology* (1999), 48: 325-336

Jaillon, O.; Aury, J.-M.; Noel, B.; Policriti, A.; Clepet, C.; Casagrande, A.; Choisne, N.; Aubourg, S.; Vitulo, N.; Jubin, C.; Vezzi, A.; Legeai, F.; Huguency, P.; Dasilva, C.; Horner, D.; Mica, E.; Jublot, D.; Poulain, J.; Bruyere, C.; Billault, A.; Segurens, B.; Gouyvenoux, M.; Ugarte, E.; Cattonaro, F.; Anthouard, V.; Vico, V.; Del Fabbro, C.; Alaux, M.; Di Gaspero, G.; Dumas, V.; Felice, N.; Paillard, S.; Juman, I.; Moroldo, M.; Scalabrin, S.; Canaguier, A.; Le Clainche, I.; Malacrida, G.; Durand, E.; Pesole, G.; Laucou, V.; Chatelet, P.; Merdinoglu, D.; Delledonne, M.; Pezzotti, M.; Lecharny, A.; Scarpelli, C.; Artiguenave, F.; Pe, M. E.; Valle, G.; Morgante, M.; Caboche, M.; Adam-Blondon, A.-F.; Weissenbach, J.; Quetier, F.; Wincker, P.; French-Italian, P. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* (2007), 449: 463-U465

Jakab, G.; Ton, J.; Flors, V.; Zimmerli, L.; Metraux, J. P.; Mauch-Mani, B. Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiology* (2005), 139: 267-274

Jaulneau, V.; Lafitte, C.; Jacquet, C.; Fournier, S.; Salamagne, S.; Briand, X.; Esquerre-Tugaye, M.-T.; Dumas, B. Ulvan, a Sulfated Polysaccharide from Green Algae, Activates Plant Immunity through the Jasmonic Acid Signaling Pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2010). Article Number: 525291 DOI: 10.1155/2010/525291

Jaulneau, V.; Lafitte, C.; Corio-Costet, M.F.; Stadnik, M.J.; Salamagne, S.; Briand, X.; Esquerre-Tugaye, M.-T.; Dumas, B. An *Ulva armoricana* extract protects plant against three powdery mildew pathogens. *European Journal of Plant Pathology* (2011), 131: 393-401

Jayaraj, J.; Wan, A.; Rahman, M.; Punja, Z. K. Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. *Crop Protection* (2008), 27: 1360-1366

Jeandet, P.; Breuil, A. C.; Adrian, M.; Weston, L. A.; Debord, S.; Meunier, P.; Maume, G.; Bessis, R. HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Analytical Chemistry* (1997), 69: 5172-5177

Johnson, R. Durable resistance-Definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology* (1981), 71: 567-568

Jones, J. D. G.; Dangl, J. L. The plant immune system. *Nature* (2006), 444: 323-329

Katz, V. A.; Thulke, O. U.; Conrath, U. A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiology* (1998), 117: 1333-1339

Keen, N.T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics* (1990), 24: 447-463

Kennelly, M. M.; Gadoury, D. M.; Wilcox, W. F.; Magarey, P. A.; Seem, R. C. Seasonal development of ontogenic resistance to downy mildew in grape berries and rachises. *Phytopathology* (2005), 95: 1445-1452

Kessmann, H.; Staub, T.; Hofmann, C.; Maetzke, T.; Herzog, J.; Ward, E.; Uknes, S.; Ryals, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* (1994), 32: 439-459

Kiss, L.; Pintye, A.; Zseli, G.; Jankovics, T.; Szentivanyi, O.; Hafez, Y. M.; Cook, R. T. A. Microcyclic conidiogenesis in powdery mildews and its association with intracellular parasitism by *Ampelomyces*. *European Journal of Plant Pathology* (2010), 126: 445-451

Kloek, A. P.; Verbsky, M. L.; Sharma, S. B.; Schoelz, J. E.; Vogel, J.; Klessig, D. F.; Kunkel, B. N. Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (coi1) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant Journal* (2001), 26: 509-522

Koga, J.; Kubota, H.; Gomi, S.; Umemura, K.; Ohnishi, M.; Kono, T. Cholic acid, a bile acid elicitor of hypersensitive cell death, pathogenesis-related protein synthesis, and phytoalexin accumulation in rice. *Plant Physiology* (2006), 140: 1475-1483

Kőrösi, K.; Ban, R.; Barna, B.; Viranyi, F. Biochemical and Molecular Changes in Downy Mildew-infected Sunflower Triggered by Resistance Inducers. *Journal of Phytopathology* (2011), 159: 471-478

Kortekamp, A.; Zyprian, E. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. *Journal of Plant Physiology* (2003), 160: 1393-1400

- Kortekamp, A. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry* (2006), 44: 58-67
- Kou, Y.; Wang, S. Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* (2010), 13: 181-185
- Krivanek, A.; Riaz, S.; Walker, M. A. Identification and molecular mapping of PdR1, a primary resistance gene to Pierce's disease in Vitis. *Theoretical and Applied Genetics* (2006), 112: 1125-1131
- Kulek, B.; Floryszak-Wieczorek, J. Local and systemic protection of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) against *Botrytis cinerea* Pers. induced by benzothiadiazole. *Acta Physiologiae Plantarum* (2002), 24: 273-278
- Kunkel, B. N.; Brooks, D. M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* (2002), 5: 325-331
- La Camera, S.; Gouzerh, G.; Dhondt, S.; Hoffmann, L.; Fritig, B.; Legrand, M.; Heitz, T. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews* (2004), 198: 267-284
- Lafon, R.; Clerjeau, M. Downy mildew. In: Pearson PC, Goheen AC, eds. *Compendium of grape diseases*, APS Press, Minnesota, USA, (1988). 11-13.
- Langcake, P.; Pryce, R. J. New Class of Phytoalexins from Grapevines. *Experientia* (1977), 33: 151-152
- Langcake, P. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon -viniferin, alpha -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* (1981), 18: 213-226
- Latunde-Dada, A. O.; Lucas, J. A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seedlings for rapid induction of resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2001), 58: 199-208
- Lawton, K. A.; Friedrich, L.; Hunt, M.; Weymann, K.; Delaney, T.; Kessmann, H.; Staub, T.; Ryals, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal* (1996), 10: 71-82
- Lawton, K. A.; Potter, S. L.; Uknes, S.; Ryals, J. Acquired-resistance signal-transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* (1994), 6: 581-588
- Leger, B.; Naud, O.; Bellon-Maurel, V.; Clerjeau, M.; Delière, L.; Cartolaro, P.; Delbac, L. GrapeMildeWS: A formally designed intergated pest management decision process against grapevine Powdery and Downy mildews. In: Manos B., Paparrizos, K.; Matsatsinis, N.; Papathanasiou, J. (ed.), *Decision Support Systems in Agriculture, Food and the Environment: Trends, Applications and Advances*. Inf. Sci. Ref, New-York, (2010) pp 246-269.

Le Henanff, G.; Heitz, T.; Mestre, P.; Mutterer, J.; Walter, B.; Chong, J. Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of Pathogenesis-Related gene expression. *Bmc Plant Biology* (2009), 9

Lee, H. I.; Leon, J.; Raskin, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic-acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1995), 92: 4076-4079

Li, J.; Brader, G.; Palva, E. T. The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* (2004), 16: 319-331

de Lima, M. T. R.; Waffo-Teguo, P.; Teissedre, P. L.; Pujolas, A.; Vercauteren, J.; Cabanis, J. C.; Merillon, J. M. Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1999), 47: 2666

Lin, J.; Gong, D.; Zhu, S.; Zhang, L.; Zhang, L. Expression of PPO and POD genes and contents of polyphenolic compounds in harvested mango fruits in relation to Benzothiadiazole-induced defense against anthracnose. *Scientia Horticulturae* (2011), 130: 85-89

Lin, X.; Liu, C.; He, P.; Chen, K.; Lin, X. Z.; Liu, C. Y.; He, P. Q.; Chen, K. S. Study on inhibitory effects of chlorogenic acid originated from the leaves of *Arctium lappa* on pathogenic fungi. *Plant Protection* (2005), 31: 35-38

Little, C. R.; Magill, C. W. Elicitation of defense response genes in sorghum floral tissues infected by *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata* at anthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2003), 63: 271-279

Lowe, K. M.; Walker, M. A. Genetic linkage map of the interspecific grape rootstock cross Ramsey (*Vitis champinii*) x Riparia Gloire (*Vitis riparia*). *Theoretical and Applied Genetics* (2006), 112: 1582-1592

Lyons, D. B.; Helson, B. V.; Jones, G. C.; McFarlane, J. W. Effectiveness of neem- and diflubenzuron-based insecticides for control of the pine false webworm, *Acantholyda erythrocephala* (L.) (Hymenoptera: Pamphiliidae). *Proceedings of the Entomological Society of Ontario* (1998), 129: 115-126

Lyon, G. Agents that can elicit induced resistance. In: Walters, D.; Newton, A.; Lyon, G. (eds) Induced resistance for plant defence : a sustainable approach to crop protection. Blackwell Publishing, Oxford, UK, (2007), pp 9-29

Ma, Q.; Zhao, X. M.; Sun, H.; Shang, H. S. Ultrastructural Study on Induced Resistance of Cucumber Plants against *Sphaerotheca fuliginea* by Oligochitosan. *Plant Pathology Journal* (2011), 27: 8-13

Maffi, D.; Iriti, M.; Pigni, M.; Vannini, C.; Faoro, F. *Uromyces appendiculatus* Infection in BTH-Treated Bean Plants: Ultrastructural Details of a Lost Fight. *Mycopathologia* (2011), 171: 209-221

- Maghuly, F.; Leopold, S.; Machado, A. d. C.; Fernandez, E. B.; Khan, M. A.; Gambino, G.; Gribaudo, I.; Schartl, A.; Laimer, M. Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: II. *Plant Cell Reports* (2006), 25: 546-553
- Malamy, J.; Carr, J. P.; Klessig, D. F.; Raskin, I. Salicylic-acid, a likely endogenous signal in the resistance response to tobacco to viral infection. *Science* (1990), 250: 1002-1004
- Malolepsza, U. Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and o-hydroxyethylorutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Crop Protection* (2006), 25: 956-962
- Marcucci, E.; Aleandri, M. P.; Chilosi, G.; Magro, P. Induced Resistance by beta-Aminobutyric Acid in Artichoke against White Mould Caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Phytopathology* (2010), 158: 659-667
- Marguerit, E.; Boury, C.; Manicki, A.; Donnart, M.; Butterlin, G.; Nemorin, A.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Merdinoglu, D.; Ollat, N.; Decroocq, S. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* (2009), 118: 1261-1278
- Marino, R.; Sevini, F.; Madini, A.; Vecchione, A.; Pertot, M.; Serra, A. D.; Versini, G.; Velasco, R.; Grando, M. S. QTL mapping for disease resistance and fruit quality in grape. In: Hajdu, E. B. E. (ed) Proceedings of the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Vols 1 and 2, (2003), pp 527-533
- Mayda, E.; Mauch-Mani, B.; Vera, P. *Arabidopsis* *dth9* mutation identifies a gene involved in regulating disease susceptibility without affecting salicylic acid-dependent responses. *Plant Cell* (2000), 12: 2119-2128
- Mazzucchi, A.; Brunelli, A. Resistance to *Erwinia amylovora* in immature pears induced by acibenzolar-S-methyl in the orchard. *Phytopathologia Mediterranea* (2008), 47: 272-276
- McDonald, A.E.; Grant, B.R.; Plaxton, W.C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *J Plant Nutr* (2001) 10: 41505-51519.
- McGovern, P. E.; Glusker, D. L.; Exner, L. J.; Voigt, M. M. Neolithic resinated wine. *Nature* (1996), 381: 480-481
- Merdinoglu, D.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Coste, P.; Dumas, V.; Haetty, S.; Butterlin, G.; Greif, C. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. In: Hajdu, E. B. E. (ed) Proceedings of the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Vols 1 and 2, (2003), pp 451-456
- Miazzi, M.; Hajjeh, H.; Faretra, F. Observations on the population biology of the grape powdery mildew fungus *Uncinula necator*. *Journal of Plant Pathology* (2003), 85: 123-129
- Miazzi, M.; Hajjeh, H.; Faretra, F. Occurrence and Distribution of Two Distinct Genetic Groups in Populations of *Erisiphe Necator* Schw. In Southern Italy. *Journal of Plant Pathology* (2008), 90: 563-573

Michel, R. H.; McGovern, P. E.; Badler, V. R. The 1st wine and beer. *Analytical Chemistry* (1993), 65: A408-A413

Mohamed, N.; Lherminier, J.; Farmer, M. J.; Fromentin, J.; Beno, N.; Houot, V.; Milat, M. L.; Blein, J. P. Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitin, oligandrin, to roots. *Phytopathology* (2007), 97: 611-620

Montarry, J.; Cartolaro, P.; Delmotte, F.; Jolivet, J.; Willocquet, L. Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during grapevine powdery mildew epidemics. *Applied and Environmental Microbiology* (2008), 74: 6327-6332

Schroeder, S.; Telle, S.; Nick, P.; Thines, M. Cryptic diversity of *Plasmopara viticola* (Oomycota, Peronosporaceae) in North America. *Organisms Diversity & Evolution* (2011), 11: 3-7

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

Moreria, F.M.; Madini, A.; Marino, R.; Zulini, L.; Stefanini, M.; Velasco, R.; Kozma, P.; Stella Grando, M. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree genetics and genomes* (2011), 7: 153-167

Myles, S.; Boyko, A. R.; Owens, C. L.; Brown, P. J.; Grassi, F.; Aradhya, M. K.; Prins, B.; Reynolds, A.; Chia, J.-M.; Ware, D.; Bustamante, C. D.; Buckler, E. S. Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2011), 108: 3530-3535

Nahar, K.; Kyndt, T.; De Vleeschauwer, D.; Hofte, M.; Gheysen, G. The Jasmonate Pathway Is a Key Player in Systemically Induced Defense against Root Knot Nematodes in Rice. *Plant Physiology* (2011), 157: 305-316

Najimi, B.; El-Jaafari, S.; Mohamed, J.; Jacquemin, J. M. Applications of molecular markers in bread wheat breeding for pest and disease resistance. *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement* (2003), 7: 17-35

Nandeeshkumar, P.; Sudisha, J.; Ramachandra, K. K.; Prakash, H. S.; Niranjana, S. R.; Shekar, S. H. Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2008), 72: 188-194

Naud, O.; Cartolaro, P.; Deliere, L.; Leger, B. Modelling and experimenting crop protection decision workflows: some lessons from GrapeMilDeWS research. *IOBC/WPRS Bulletin* (2011), 67: 93-100

Nemestothy, G. S.; Guest, D. I. Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1990), 37: 207-219

Niki, T.; Mitsuhashi, I.; Seo, S.; Ohtsubo, N.; Ohashi, Y. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology* (1998), 39: 500-507

Nirata, N.K.; Das, D.K.; Srivastava, S.V.; Sopory, S.K.; Upadhyaya, K.C. Expression of rice chitinase gene enhances antifungal potential in transgenic grapevine (*Vitis vinifera*). *Vitis* (2010), 49: 181-187.

Nunez, Y.; Gallego, J.; Ponz, F.; Raposo, R. Analysis of population structure of *Erysiphe necator* using AFLP markers. *Plant Pathology* (2006), 55: 650-656

Olli, S.; Guruprasad, L.; Kirti, P. B. Characterization of defensin (Tfgd2) from *Trigonella foenum-graecum*. *Current Science* (2007), 93: 365-369

Olli, S.; Kirti, P. B. Cloning, characterization and antifungal activity of defensin Tfgd1 from *Trigonella foenum-graecum* L. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (2006), 39: 278-283

Pajot, E.; Le Corre, D.; Silué, D. PhytoGard and DL- β amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L). *European Journal of Plant Pathology* (2001), 107: 861-869

Pajot, E. Stimulators of natural defences: new allies for rational protection. *PHM Revue Horticole* (2005): p14

Parker, J. E.; Schulte, W.; Hahlbrock, K.; Scheel, D. An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* sp *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (1991), 4: 19-27

Pasquer, F.; Isidore, E.; Zarn, J.; Keller, B. Specific patterns of changes in wheat gene expression after treatment with three antifungal compounds. *Plant Molecular Biology* (2005), 57: 693-707

Pauquet, J.; Bouquet, A.; This, P.; Adam-Blondon, A. F. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics* (2001), 103: 1201-1210

Peng, D.-H.; Qiu, D.-W.; Ruan, L.-F.; Zhou, C.-F.; Sun, M. Protein Elicitor PemG1 from *Magnaporthe grisea* Induces Systemic Acquired Resistance (SAR) in Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (2011), 24: 1239-1246

Perazzolli, M.; Dagostin, S.; Ferrari, A.; Elad, Y.; Pertot, I. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological Control* (2008), 47: 228-234

Perazzolli, M.; Bampi, F.; Faccin, S.; Moser, M.; De Luca, F.; Ciccotti, A. M.; Velasco, R.; Gessler, C.; Pertot, I.; Moser, C. *Armillaria mellea* Induces a Set of Defense Genes in

Grapevine Roots and One of Them Codifies a Protein with Antifungal Activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (2010), 23: 485-496

Perazzolli, M.; Roatti, B.; Bozza, E.; Pertot, I. Trichoderma harzianum T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biological Control* (2011), 58: 74-82

Perello, A. E.; Dal Bello, G. M. Suppression of tan spot and plant growth promotion of wheat by synthetic and biological inducers under field conditions. *Annals of Applied Biology* (2011), 158: 267-274

Perez, L.; Rodriguez, M. E.; Rodriguez, F.; Roson, C. Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. *Crop Protection* (2003), 22: 405-413

Peros, J. P.; Troulet, C.; Guerriero, M.; Michel-Romiti, C.; Notteghem, J. L. Genetic variation and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, in southern France. *European Journal of Plant Pathology* (2005), 113: 407-416

Pezet, R.; Perret, C.; Jean-Denis, J. B.; Tabacchi, R.; Gindro, K.; Viret, O. delta-viniferin, a resveratrol dehydrotimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003), 51: 5488-5492

Pezet, R.; Gindro, K.; Viret, O.; Spring, J. L. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2004), 65: 297-303

Pieterse, C. M. J.; Loon, L. C. v. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* (1999), 4: 52-58

Planchon, J.E. Monographie des *Ampelidae* vraies. In: *Monographia Phanerogamarum* (1887) 5, pp 305–364

Pleskova, V.; Kasparovsky, T.; Oboril, M.; Ptackova, N.; Chaloupkova, R.; Ladislav, D.; Damborsky, J.; Lochman, J. Elicitin-membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: Role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. *Plant Physiology and Biochemistry* (2011), 49: 321-328

Polesani, M.; Desario, F.; Ferrarini, A.; Zamboni, A.; Pezzotti, M.; Kortekamp, A.; Polverari, A. CDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *Bmc Genomics* (2008), 9: 142, 17 pages.

Pontin, M. A.; Piccoli, P. N.; Francisco, R.; Bottini, R.; Martinez-Zapater, J. M.; Lijavetzky, D. Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaves induced by ultraviolet-B radiation. *Bmc Plant Biology* (2010), 10: Article Number: 224 DOI: 210.1186/1471-2229-1110-1224

Porat, R.; Vinokur, V.; Weiss, B.; Cohen, L.; Daus, A.; Goldschmidt, E. E.; Droby, S. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by beta-aminobutyric acid. *European Journal of Plant Pathology* (2003), 109: 901-907

Pryce, R. J.; Langcake, P. Alpha-viniferin - antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry* (1977), 16: 1452-1454

Qiu, W. P.; Kovacs, L. G.; Hou, H. Defense-related candidate genes in *Vitis* species. *Acta Horticulturae* (2005): 447-457

Raynal, G.; Ravise, A.; Bompeix, G. Action of aluminium tris-O-ethylphosphonate on pathogenicity of *Plasmopara viticola* and on stimulation of defence reactions of grapevine. *Annales de Phytopathologie* (1980), 12: 163-175

Reisch, B. I.; Kikkert, J.; Vidal, J.; Ali, G. S.; Gadoury, D.; Seem, R.; Wallace, P. Genetic transformation of *Vitis vinifera* to improve disease resistance. *Acta Horticulturae* (2003): 303-308

Reuveni, R.; Dor, G.; Raviv, M.; Reuveni, M.; Tuzun, S. Systemic resistance against *Sphaerotheca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponics system, and its control by foliar spray of mono-potassium phosphate. *Crop Protection* (2000), 19: 355-361

Reuveni, M.; Zahavi, T.; Cohen, Y. Controlling downy mildew (*Plasmopara viticola*) in field-grown grapevine with beta-aminobutyric acid (BABA). *Phytoparasitica* (2001), 29: 125-133

Riaz, S.; Tenscher, A. C.; Ramming, D. W.; Walker, M. A. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theoretical and Applied Genetics* (2011), 122: 1059-1073

Renard-Merlier, D.; Randoux, B.; Nowak, E.; Farcy, F.; Durand, R.; Reignault, P. Ioduric acid, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* (2007), 68: 1156-1164

Renault, A. S.; Deloire, A.; Bierne, J. Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis* (1996), 35

Reuveni, M.; Zahavi, T.; Cohen, Y. Controlling downy mildew (*Plasmopara viticola*) in field-grown grapevine with beta-aminobutyric acid (BABA). *Phytoparasitica* (2001), 29: 125-133

Robatzek, S.; Somssich, I. E. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev* (2002), 16: 1139-1149

Rohilla, R.; Singh, U. S.; Singh, R. L. Mode of action of acibenzolar-S-methyl against sheath blight of rice, caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Pest Management Science* (2002), 58: 63-69

Roman de, M.; Fernandez, I.; Wyatt, T.; Sahrawy, M.; Heil, M.; Pozo, M. J. Elicitation of foliar resistance mechanisms transiently impairs root association with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology* (2011), 99: 36-45

- Romanazzi, G.; D'Ascenzo, D.; Murolo, S. Field treatment with resistance inducers for the control of grapevine "Bois noir". *Journal of Plant Pathology* (2009), 91: 677-682
- Rossard, S.; Roblin, G.; Atanassova, R. Ergosterol triggers characteristic elicitation steps in *Beta vulgaris* leaf tissues. *Journal of Experimental Botany* (2010), 61: 1807-1816
- Ryals, J. A.; Neuenschwander, U. H.; Willits, M. G.; Molina, A.; Steiner, H. Y.; Hunt, M. D. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* (1996), 8: 1809-1819
- Saindrenan, P.; Barchietto, T.; Avelino, J.; Bompeix, G. Effects of phosphite on phytoalexin accumulation in leaves of cowpea infected with *Phytophthora-cryptogea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1988), 32: 425-435
- Saindrenan, P.; Barchietto, T.; Bompeix, G. Effects of phosphonate on the elicitor activity of culture filtrates of *Phytophthora-cryptogea* in *Vigna-unguiculata*. *Plant Science* (1990), 67: 245-251
- Santiago, R.; Quintana, J.; Rodriguez, S.; Maria Diaz, E.; Estrella Legaz, M.; Vicente, C. An elicitor isolated from smut teliospores (*sporisorium scitamineum*) enhances lignin deposition on the cell wall of both sclerenchyma and xylem in sugarcane leaves. *Pakistan Journal of Botany* (2010), 42(4): 2867-2881.
- Saucedo-Garcia, M.; Guevara-Garcia, A.; Gonzalez-Solis, A.; Cruz-Garcia, F.; Vazquez-Santana, S.; Markham, J. E.; Guadalupe Lozano-Rosas, M.; Dietrich, C. R.; Ramos-Vega, M.; Cahoon, E. B.; Gavilanes-Ruiz, M. MPK6, sphinganine and the LCB2a gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytologist* (2011), 191: 943-957
- Scheideler, M.; Schlaich, N. L.; Fellenberg, K.; Beissbarth, T.; Hauser, N. C.; Vingron, M.; Slusarenko, A. J.; Hoheisel, J. D. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *Journal of Biological Chemistry* (2002), 277: 10555-10561
- Schnee, S. Facteurs de résistance à l'oïdium (*Erysiphe necator* Schwein.) chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). (2008), Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel pour l'obtention du titre de Docteur ès Sciences.
- Schnee, S.; Viret, O.; Gindro, K. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2008), 72: 128-133
- Schröder, S.; Telle, S.; Nick, P.; Thines, M. Cryptic diversity of *Plasmopara viticola* (Oomycota, Peronosporaceae) in North America. *Organisms diversity and Evolution*. (2011), 11: 3-7
- Schroder, J. The family of chalcone synthase-related proteins: Functional diversity and evolution. In: Romeo, J. T. I. R. V. L. D. V. (ed) *Evolution of Metabolic Pathways*, (2000), pp 55-89

- Siegrist, L.; Glenewinkel, D.; Kolle, C.; Schmidtke, M. Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* (1997), 104: 599-610
- Skłodowska, M.; Gajewska, E.; Kuzniak, E.; Mikicinski, A.; Sobiczewski, P. BTH-mediated antioxidant system responses in apple leaf tissues. *Scientia Horticulturae* (2010), 125: 34-40
- Slaughter, A.; Hamiduzzaman, M. M.; Gindro, K.; Neuhaus, J. M.; Mauch-Mani, B. Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology* (2008), 122: 185-195
- Smillie, R. ; Grant, B. R. ; Guest, D.I. The mode of action of phosphite - evidence for both direct and indirect modes of action on 3 *Phytophthora* Spp in Plants. *Phytopathology* (1989), 79: 921-926.
- Song, F. M.; Goodman, R. M. Molecular cloning and characterization of a rice phosphoinositide-specific phospholipase C gene, OsPI-PLC1, that is activated in systemic acquired resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2002), 61: 31-40
- Soyez, J. L. New phosphonates and potassium polyvalents for use in viticulture (1993-2001). *Progres Agricole et Viticole* (2001), 118: 487-490
- Speiser, B.; Berner, A.; Haseli, A.; Tamm, L. Control of downy mildew of grapevine with potassium phosphonate: Effectivity and phosphonate residues in wine. *Biological Agriculture & Horticulture* (2000), 17: 305-312
- Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Metraux, J. P. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* (1997), 35: 325-370
- Stummer, B. E.; Zanker, T.; Harvey, P. R.; Scott, E. S. Detection and quantification of *Erysiphe necator* DNA in wine grapes and resultant must and juice. *Mycological Research* (2006), 110: 1184-1192
- Suo, Y. Y.; Leung, D. W. M. Elevation of extracellular beta-1,3-glucanase and chitinase activities in rose in response to treatment with acibenzolar-S-methyl and infection by D-rosae. *Journal of Plant Physiology* (2001), 158: 971-976
- Tally, A.; Oostendorp, M.; Lawton, K.; Staub, T.; Bassi, B. Commercial development of elicitors of induced resistance to pathogens. In: Agrawal, A.; Tuzun, S.; Bent, E. (eds) *Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology, and agriculture*. American Phytopathological Society (APS Press), (1999), pp 357-369
- Tanner, G. J.; Francki, K. T.; Abrahams, S.; Watson, J. M.; Larkin, P. J.; Ashton, A. R. Proanthocyanidin biosynthesis in plants - Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *Journal of Biological Chemistry* (2003), 278: 31647-31656
- Tavallali, V.; Karimi, S.; Mohammadi, S.; Hojati, S. Effects of beta-aminobutyric acid on the induction of resistance to *Penicillium italicum*. *World Applied Sciences Journal* (2008), 5: 345-351

Thaler, J. S.; Fidantsef, A. L.; Duffey, S. S.; Bostock, R. M. Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: A field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology* (1999), 25: 1597-1609

Thara, V. K.; Tang, X. Y.; Gu, Y. Q.; Martin, G. B.; Zhou, J. M. *Pseudomonas syringae* pv tomato induces the expression of tomato EREBP-like genes Pti4 and Pti5 independent of ethylene, salicylate and jasmonate. *Plant Journal* (1999), 20: 475-483

Thi, T. H. D.; Puig, R. C.; Kim, H. K.; Erkelens, C.; Lefeber, A. W. M.; Linthorst, H. J. M.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. Effect of benzothiadiazole on the metabolome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* (2009), 47: 146-152

Thomma, B.; Eggermont, K.; Tierens, K.; Broekaert, W. F. Requirement of functional ethylene-insensitive 2 genes for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* (1999), 121: 1093-1101

Ton, J.; Mauch-Mani, B. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal* (2004), 38: 119-130

Trotel-Aziz, P.; Couderchet, M.; Vernet, G.; Aziz, A. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* (2006), 114: 405-413

Trouvelot, S.; Varnier, A. L.; Allegre, M.; Mercier, L.; Baillieul, F.; Arnould, C.; Gianinazzi-Pearson, V.; Klarzynski, O.; Joubert, J. M.; Pugin, A.; Daire, X. A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (2008), 21: 232-243

Turner, J. G.; Ellis, C.; Devoto, A. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* (2002), 14: S153-S164

Van Loon, L. C.; Van Strien, E. A.. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (1999), 55: 85-97

Van Loon, L. C. ; Rep, M.; Pieterse, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* (2006), 44: 135-162

Van Loon, L. C.; Bakker, P. A. H. M.; van der Heijdt, W. H. W.; Wendehenne, D.; Pugin, A. Early Responses of Tobacco Suspension Cells to Rhizobacterial Elicitors of Induced Systemic Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (2008), 21: 1609-1621

Varnier, A. L.; Sanchez, L.; Vatsa, P.; Boudesocque, L.; Garcia-Brugger, A.; Rabenoelina, F.; Sorokin, A.; Renault, J. H.; Kauffmann, S.; Pugin, A.; Clement, C.; Baillieul, F.; Dorey, S. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant Cell and Environment* (2009), 32: 178-193

Verica, J. A.; Maximova, S. N.; Strem, M. D.; Carlson, J. E.; Bailey, B. A.; Guiltinan, M. J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. *Plant Cell Reports* (2004), 23: 404-413

Vidhyasekaran, P. Defense genes for crop disease management, *Genetic engineering, molecular biology and tissue culture for crop pest and disease management*. (1993), 17-30

Vijayan, P.; Shockey, J.; Levesque, C. A.; Cook, R. J.; Browse, J. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1998), 95: 7209-7214

Walters, D.; Newton, A.; Lyon, G. Induced resistance for plant defence : a sustainable approach to crop protection. Blackwell Publishing, Oxford UK, (2007), pp 258

Walters, D. R.; Havis, N. D.; Sablou, C.; Walsh, D. J. Possible trade-off associated with the use of a combination of resistance elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2011), 75: 188-192

Ward, E. R.; Uknes, S. J.; Williams, S. C.; Dincher, S. S.; Wiederhold, D. L.; Alexander, D. C.; Ahlgoy, P.; Mettraux, J. P.; Ryals, J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* (1991), 3: 1085-1094

Welter, L. J.; Gokturk-Baydar, N.; Akkurt, M.; Maul, E.; Eibach, R.; Toepfer, R.; Zyprian, E. M. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Molecular Breeding* (2007), 20: 359-374

Whan, J. A.; Dann, E. K.; Smith, L. J.; Aitken, E. A. B. Acibenzolar-S-methyl-induced alteration of defence gene expression and enzyme activity in cotton infected with *Fusarium oxysporum* f. sp *vasinfectum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2008), 73: 175-182

Wiese, W.; Vornam, B.; Krause, E.; Kindl, H. Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. *Plant Molecular Biology* (1994), 26

Wiese, J.; Kranz, T.; Schubert, S. Induction of pathogen resistance in barley by abiotic stress. *Plant Biology* (2004), 6: 529-536

Wildermuth, M. C.; Dewdney, J.; Wu, G.; Ausubel, F. M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* (2001), 414: 562-565

Wise, M. L. Effect of Chemical Systemic Acquired Resistance Elicitors on Avenanthramide Biosynthesis in Oat (*Avena sativa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2011), 59: 7028-7038

Wurms, K.; Labbe, C.; Benhamou, N.; Belanger, R. R. Effects of Milsana and benzothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on cucumber. *Phytopathology* (1999), 89: 728-736

Yamaguchi, Y.; Barona, G.; Ryan, C. A.; Pearce, G. GmPep914, an Eight-Amino Acid Peptide Isolated from Soybean Leaves, Activates Defense-Related Genes. *Plant Physiology* (2011), 156: 932-942

Yamamoto, T.; Iketani, H.; Ieki, H.; Nishizawa, Y.; Notsuka, K.; Hibi, T.; Hayashi, T.; Matsuta, N. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports* (2000), 19: 639-646

Yang, J. W.; Yi, H. S.; Kim, H.; Lee, B.; Lee, S.; Ghim, S. Y.; Ryu, C. M. Whitefly infestation of pepper plants elicits defence responses against bacterial pathogens in leaves and roots and changes the below-ground microflora. *Journal of Ecology* (2011), 99: 46-56

Yu, G. Y.; Muehlbauer, G. J. Benzothiadiazole-induced gene expression in wheat spikes does not provide resistance to *Fusarium* head blight. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2001), 59: 129-136

Zhang, S. Q.; Klessig, D. F. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* (2001), 6: 520-527

Zhang, Z.; Bi, Y.; Ge, Y.; Wang, J.; Deng, J.; Xie, D.; Wang, Y. Multiple pre-harvest treatments with acibenzolar-S-methyl reduce latent infection and induce resistance in muskmelon fruit. *Scientia Horticulturae* (2011), 130: 126-132

Zhao, J.; Davis, L. C.; Verpoorte, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* (2005), 23: 283-333

Zhu, Q.; Maher, E. A.; Masoud, S.; Dixon, R. A.; Lamb, C. J. Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio-Technology* (1994), 12: 807-812

Zhu, Y. J.; Qiu, X. H.; Moore, P. H.; Borth, W.; Hu, J.; Ferreira, S.; Albert, H. H. Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2003), 63: 237-248

Ziadi, S.; Barbedette, S.; Godard, J. F.; Monot, C.; Le Corre, D.; Silue, D. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis)-downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathology* (2001), 50: 579-586

Zimmerli, L.; Mettraux, J. P.; Mauch-Mani, B. beta-aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* (2001), 126: 517-523

Zyprian, E.; Eibach, R.; Topfer, R. Comparative molecular mapping in segregating populations of grapevine. In: Hajdu, E. B. E. (ed) Proceedings of the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Vols 1 and 2, (2003), pp 73-77

ANNEXES

Annexe 1

Essai Mildiou 2009

Modalités	Fréquence d'applications	Concentrations		
		Matière active	Produit	
N 01	Témoins non traités			
N 02	Bion 50 WG (BTH)	7 jours	2 g/L	4 g/L
N 03	Aliette (Fosétyl-Aluminium)	7 jours	2,5 g/L	3,125 g/L
N 04	Dithane (Mancozèbe)	7 jours	2,1 g/L	2,8 g/L

Représentation schématique de la parcelle expérimentale :



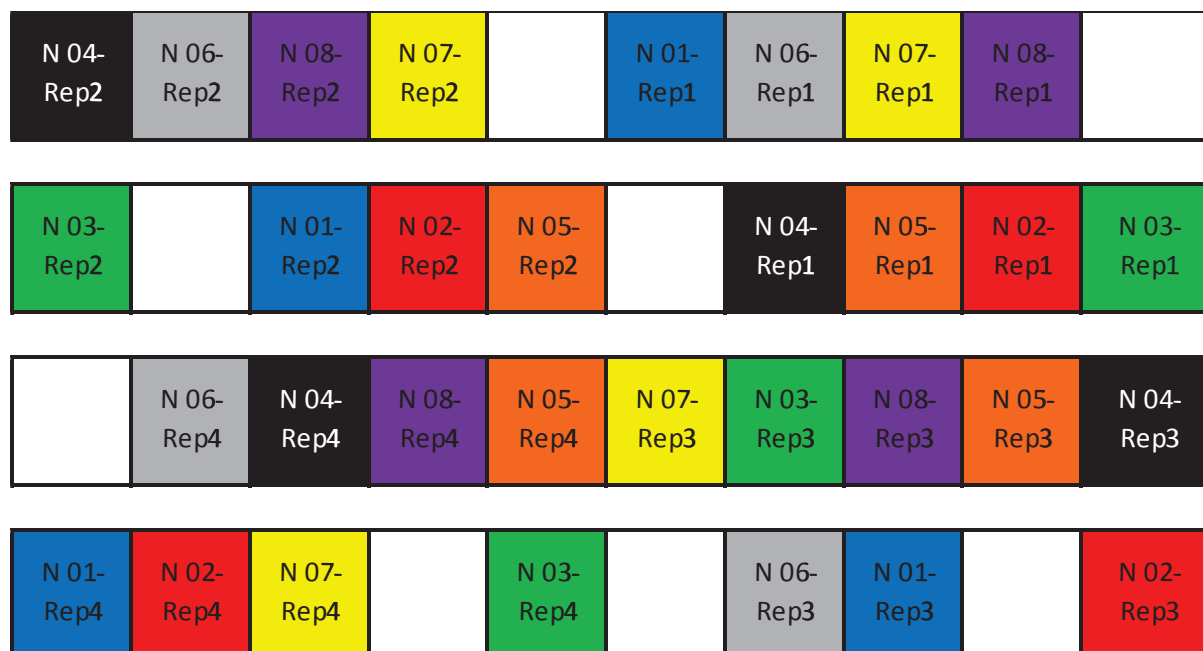
Chaque carré représente 1 bloc de 3 ceps. Chaque modalité est répétée 4 fois.
En blanc, blocs non utilisés.

Annexe 2

Essai Mildiou 2010

Modalités	Fréquence d'applications	Concentrations	
		Matière active	Produit
N 01	Témoins non traités		
N 02	Bion 50 WG (BTH)	2 g/L	4 g/L
N 03	Aliette (Fosétyl-Aluminium)	2,5 g/L	3,125 g/L
N 04	Dithane (Mancozèbe)	2,1 g/L	2,8 g/L
N 05	Bion 50 WG (BTH)	1 g/L	2 g/L
N 06	Dithane (Mancozèbe)	1,05 g/L	1,4 g/L
N 07	Bion 50 WG (BTH) + Dithane (Mancozèbe)	1 + 1,05 g/L	2 + 1,4 g/L
N 08	Bion 50 WG (BTH) alternance	1 g/L	2 g/L
	Dithane (Mancozèbe) alternance	1,05 g/L	1,4 g/L

Représentation schématique de la parcelle expérimentale :



Chaque carré représente 1 bloc de 3 ceps. Chaque modalité est répétée 4 fois.
En blanc, blocs non utilisés.

Annexe 3

Essai Oïdium 2010

Modalités		Fréquence d'applications	Concentrations	
			Matière active	Produit
N 01	Témoins non traités			
N 02	Bion 50 WG (BTH)	7 jours	2 g/L	4 g/L
N 03	Aliette (Fosétyl-Aluminium)	7 jours	2,5 g/L	3,125 g/L
N 04	Corail (Tébuconazole)	7 jours	0,1 g/L	0,4 mg/L

Représentation schématique de la parcelle expérimentale :



Chaque carré représente 1 bloc de 3 ceps. Chaque modalité est répétée 4 fois.
En blanc, blocs non utilisés.

Annexe 4

Essai Mildiou 2011

Représentation schématique de la parcelle expérimentale :

N 01- Rep2	N 13- Rep2	N 02- Rep2	N 08- Rep2	N 08- Rep1	N 12- Rep1	N 06- Rep1	N 11- Rep1	
	N 07- Rep2			N 10- Rep1	N 02- Rep1			N 05- Rep1
			N 03- Rep2	N 04- Rep1	N 03- Rep1	N 09- Rep1		
	N 06- Rep2		N 11- Rep2	N 04- Rep2	N 07- Rep1		N 01- Rep1	
N 10- Rep2	N 09- Rep2	N 12- Rep2		N 05- Rep3			N 02- Rep3	N 08- Rep3
			N 08- Rep4	N 02- Rep4		N 01- Rep3	N 12- Rep3	
N 09- Rep4	N 13- Rep4		N 01- Rep4	N 07- Rep4	N 04- Rep4	N 07- Rep3	N 06- Rep3	N 10- Rep3
	N 10- Rep4	N 11- Rep4	N 06- Rep4	N 12- Rep4	N 03- Rep3	N 11- Rep3	N 09- Rep3	N 04- Rep3

Chaque carré représente 1 bloc de 3 cepes Chaque modalité est répétée 4 fois. En blanc, blocs non utilisés.

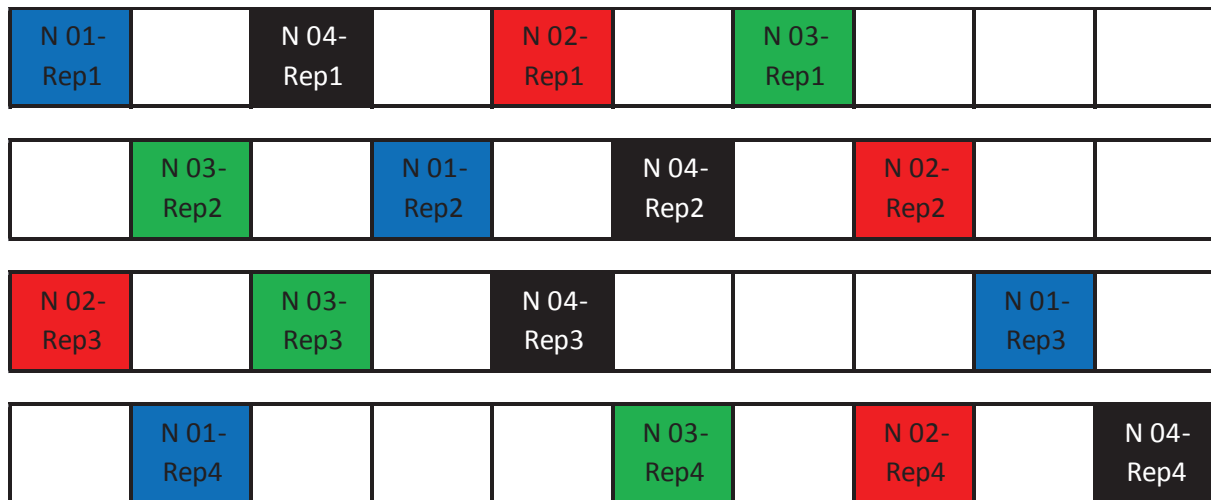
Modalités	Fréquence d'applications	Concentrations	
		Matière active	Produit
N 01 Témoins non traités			
N 02 Bion 50 WG (BTH)	7 jours	2 g/L	4 g/L
N 03 Aliette (Fosétyl-Aluminium)	7 jours	2,5 g/L	3,125 g/L
N 04 Dithane (Mancozèbe)	7 jours	2,1 g/L	2,8 g/L
N 05 Bion 50 WG (BTH)	7 jours	1 g/L	2 g/L
N 06 Dithane (Mancozèbe)	7 jours	1,05 g/L	1,4 g/L
N 07 Bion 50 WG (BTH) + Dithane (Mancozèbe)	7 jours	1 + 1,05 g/L	2 + 1,4 g/L
N 08 Bion 50 WG (BTH) alternance Dithane (Mancozèbe) alternance	7 jours	1 g/L	2 g/L
N 09 Aliette (Fosétyl-Aluminium)	7 jours	1,25 g/L	1,563 g/L
N 10 Bion 50 WG (BTH) + Aliette (Fosétyl-Aluminium)	7 jours	1 + 1,25 g/L	2 + 1,563 g/L
N 11 Bion 50 WG (BTH) alternance Aliette (Fosétyl-Aluminium) alternance	7 jours	1 g/L	2 g/L
N 12 Bion 50 WG (BTH)	14 jours	2 g/L	4 g/L
N 13 Dithane (Mancozèbe)	14 jours	1,05 g/L	1,4 g/L

Annexe 5

Essai Oïdium 2011

Modalités	Fréquence d'applications	Concentrations	
		Matière active	Produit
N 01	Témoins non traités		
N 02	Bion 50 WG (BTH)	2 g/L	4 g/L
N 03	Aliette (Fosétyl-Aluminium)	2,5 g/L	3,125 g/L
N 04	Corail (Tébuconazole)	0,1 g/L	0,4 mg/L

Représentation schématique de la parcelle expérimentale :



Chaque carré représente 1 bloc de 3 ceps répétés 4 fois.
En blanc, bloc non utilisés.

Annexe 6

Échelle BBCH des stades phénologiques de la vigne (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*)

Code Définition

Stade principal 0 : bourgeonnement ou débourrement

- 00 dormance: les bourgeons d'hiver sont pointus à arrondis, suivant la variété ils sont brun clair à foncé et les écailles sont plus ou moins appliquées aux bourgeons
- 01 début du gonflement des bourgeons: les bourgeons s'allongent à l'intérieur des écailles
- 03 fin du gonflement des bourgeons, les bourgeons ne sont pas encore verts
- 05 «stade de la bourre»: une protection cotonneuse est nettement visible
- 07 début de l'éclatement des bourgeons (débourrement): l'extrémité verte de la jeune pousse est juste visible
- 09 débourrement: l'extrémité verte de la jeune pousse est nettement visible

Stade principal 1 : développement des feuilles

- 11 première feuille étalée et écartée de la pousse
- 12 2 feuilles étalées
- 13 3 feuilles étalées
- 1. et ainsi de suite ...
- 19 9 ou davantage de feuilles sont étalées

Stade principal 5 : apparition des inflorescences

- 53 les grappes (inflorescences) sont nettement visibles
- 55 les grappes augmentent de taille, les boutons floraux sont agglomérés
- 57 les grappes sont bien développées, les fleurs se séparent

Stade principal 6 : la floraison

- 60 les premiers capuchons floraux se séparent du réceptacle
- 61 début de la floraison: 10% des capuchons floraux sont tombés
- 62 20% des capuchons floraux sont tombés
- 63 floraison partielle: 30% des capuchons floraux sont tombés
- 64 40% des capuchons floraux sont tombés
- 65 mi-floraison: 50% des capuchons floraux sont tombés
- 66 60% des capuchons floraux sont tombés
- 67 70% des capuchons floraux sont tombés
- 68 la floraison s'achève: 80% des capuchons floraux sont tombés
- 69 fin de la floraison

Stade principal 7: développement des fruits

- 71 nouaison: début du développement des fruits, toutes les pièces florales sont tombées
- 73 les fruits (baies) ont la grosseur de plombs de chasse, les grappes commencent à s'incliner vers le bas
- 75 les baies ont la grosseur de petits pois, les grappes sont en position verticale
- 77 début de la fermeture de la grappe (les baies commencent à se toucher)
- 79 la fermeture de la grappe est complète, les fruits ont fini de grossir

Stade principal 8 : maturation des baies

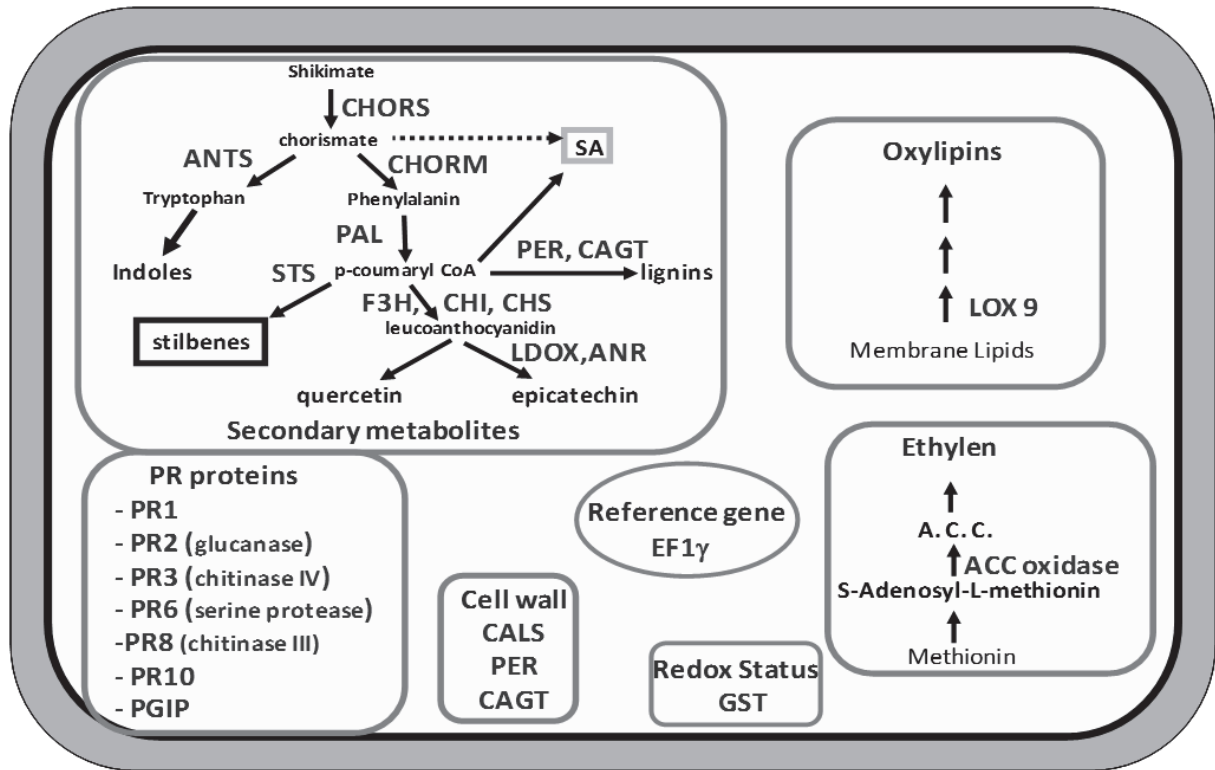
- 81 début de la maturation: les baies commencent à s'éclaircir et/ou à changer de couleur
- 83 éclaircissement et/ou changement de couleur en cours
- 85 véraison: les baies deviennent molles au toucher
- 89 les baies sont mûres pour la vendange

Stade principal 9 : sénescence ou début du repos végétatif

- 91 après la vendange: l'aoûtement du bois est terminé
- 92 début de la coloration des feuilles
- 93 début de la chute des feuilles
- 95 50% des feuilles sont tombées
- 97 fin de la chute des feuilles
- 99 baies mûres en phase de conservation

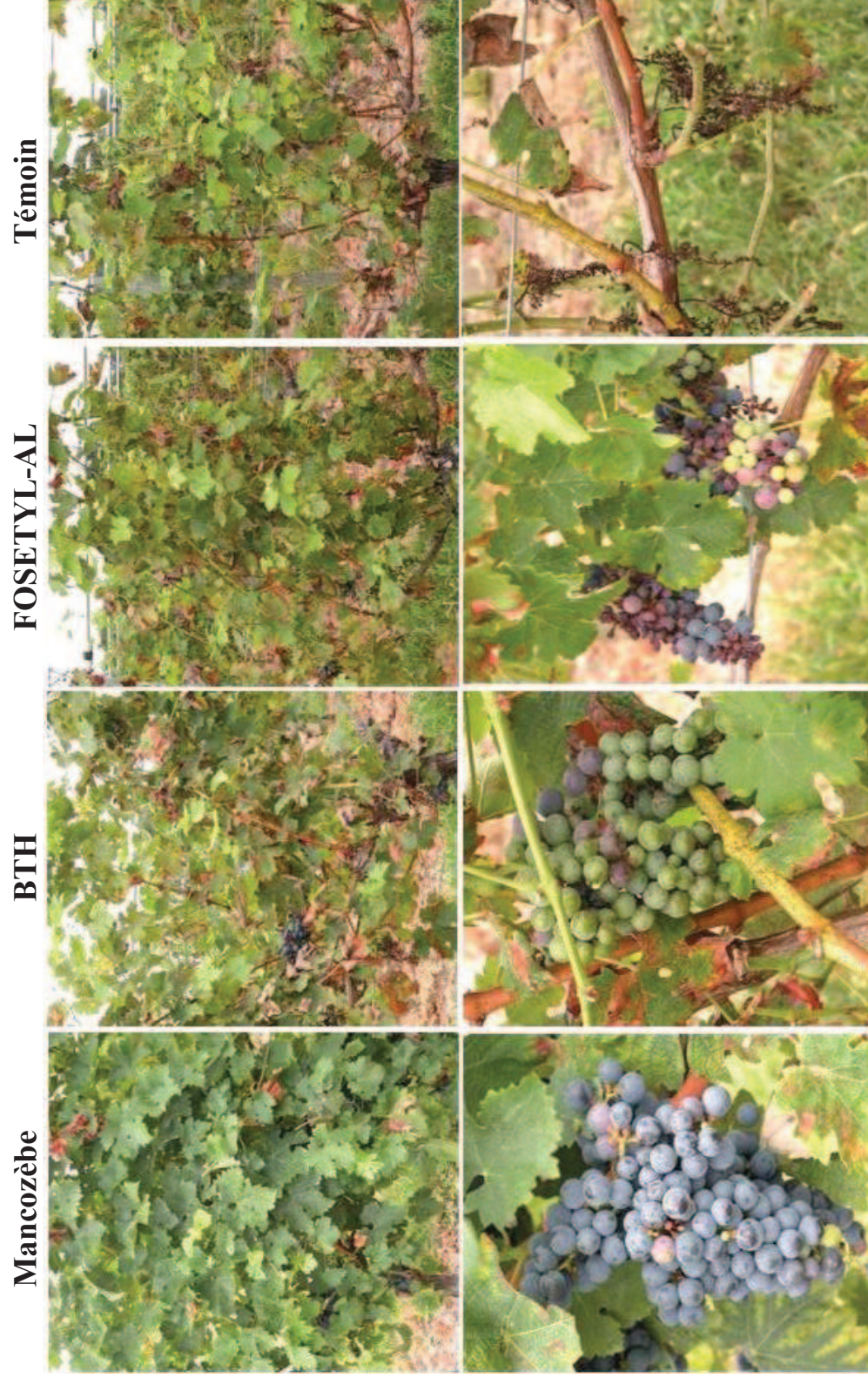
Annexe 7

Représentation schématique des voies métaboliques suivies au niveau moléculaire



Annexe 8

Photographies des feuilles et des grappes des différentes modalités de traitement de l'essai mildiou 2009 au 25 août



Annexe 9

Photographies des feuilles et des grappes des différentes modalités de traitement de l'essai mildiou 2009 au 14 septembre

Mancozèbe



BTH



FOSETYL-AL

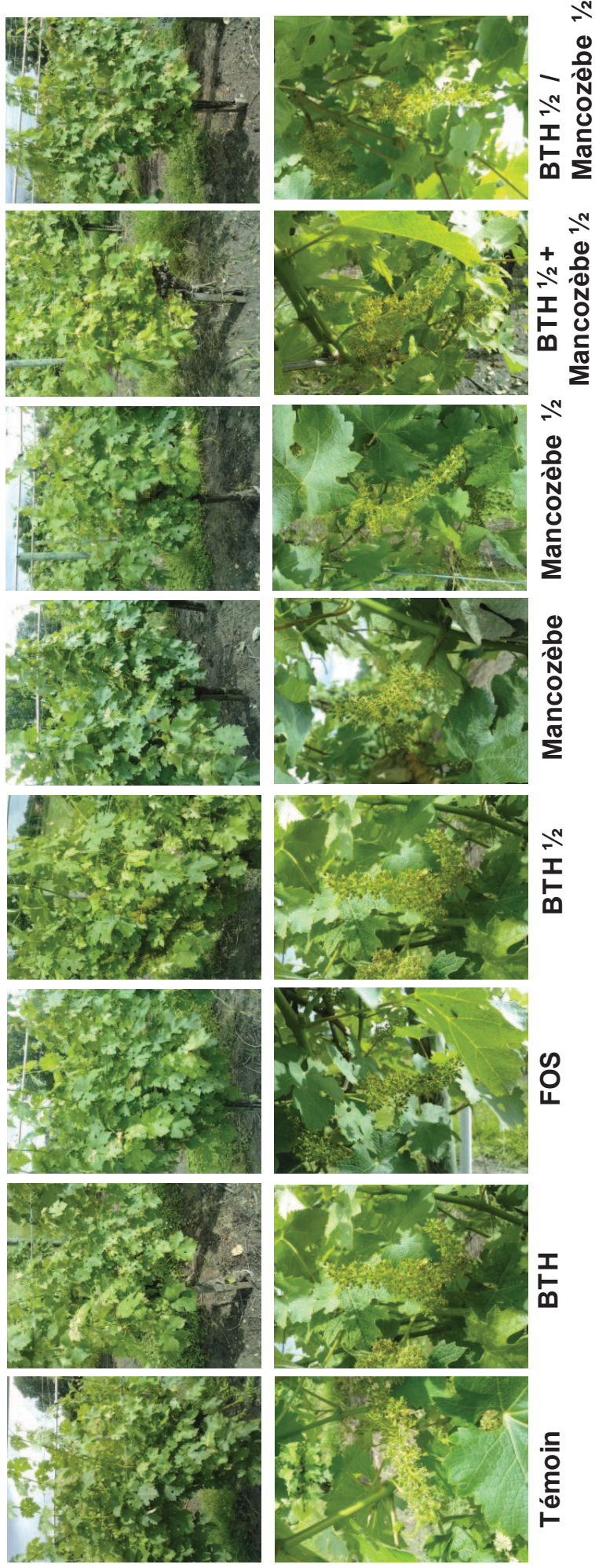


Témoin



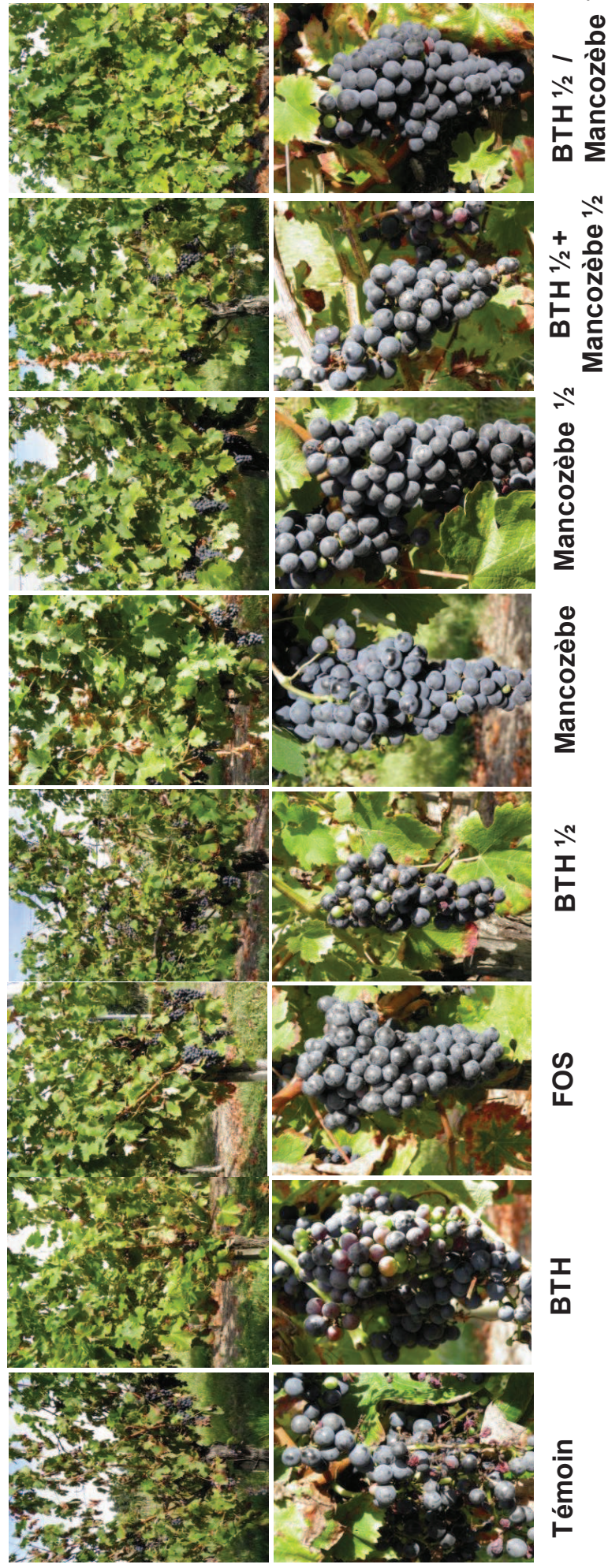
Annexe 10

Photographies des feuilles et des grappes de différentes modalités de traitement de l'essai mildiou 2010 au 13 juin
















Annexe 11

Photographies des feuilles et des grappes des différentes modalités de traitement de l'essai mildiou 2010 au 14 septembre



Annexe 12

Photographies des grappes des différentes modalités de traitement de l'essai mildiou 2011 au 25 août

						
Témoin	BTH	FOS	Mancozèbe	B TH ½	FOS ½	Mancozèbe ½
						
BTH ½ + Mancozèbe ½	BTH ½ / Mancozèbe ½	BTH ½ + FOS ½	BTH ½ / FOS ½	BTH 14J	Mancozèbe 14J	

Annexe 13

Photographies des feuilles et des grappes des différentes modalités de traitement de l'essai oïdium 2010 au 13 juillet

Témoin



BTH



FOS



Fongicide



Annexe 14

Photographies des feuilles et des grappes des différentes modalités de traitement de l'essai oïdium 2010 au 14 septembre

Témoin



BTH



FOS



Fongicide



Annexe 15

Photographies des grappes des différentes modalités de traitement de l'essai oïdium 2011 au 25 août



Témoin



BTH



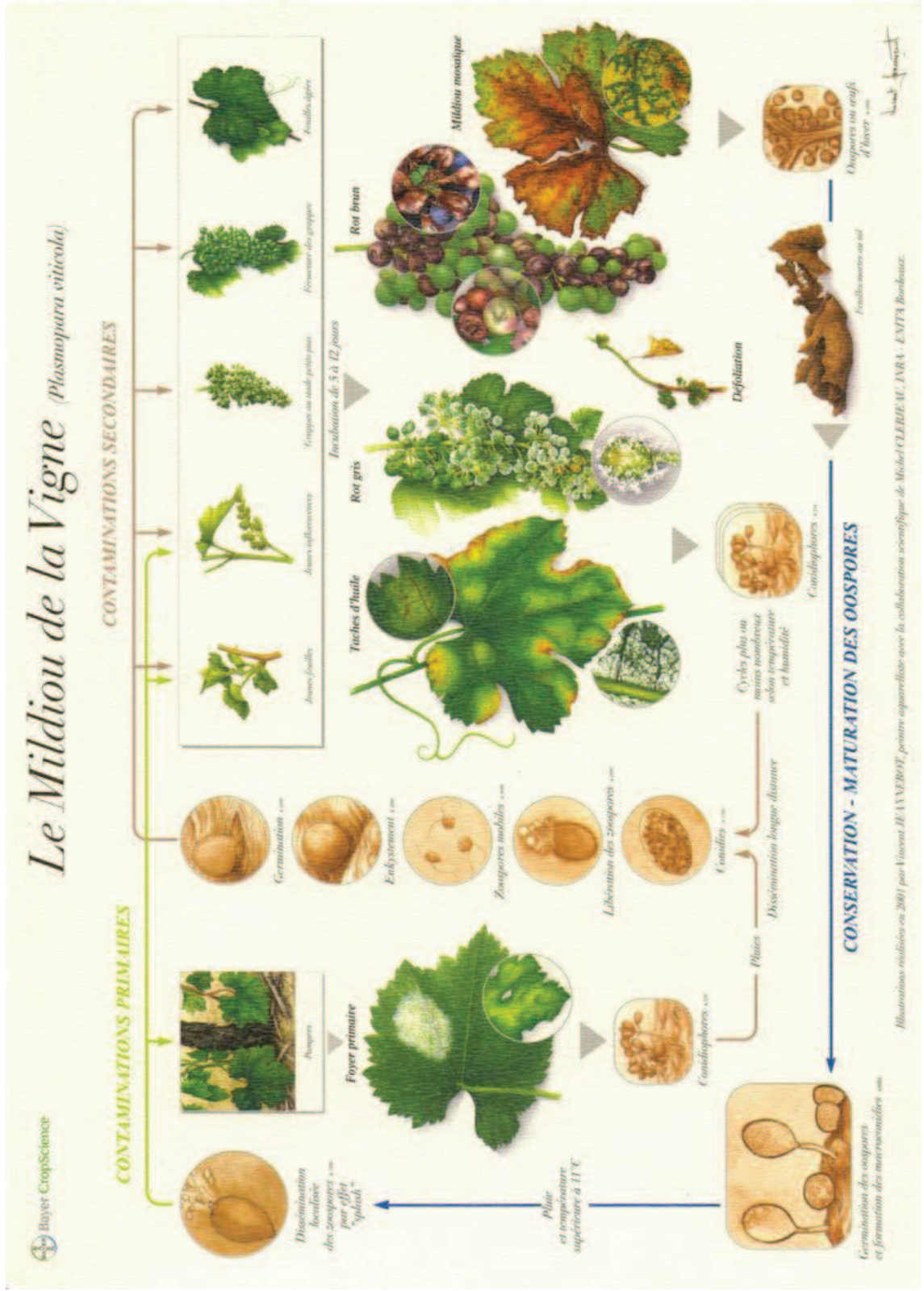
FOS



Tébuconazole

Annexe 16

Illustration de Vincent Jeannerot sur le cycle biologique de *P. viticola*



ANNEXE 18

Dufour, M.-C.; Fontaine, S.; Montarry, J.; Corio-Costet, M.-F. Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Management Science* (2011), 67: 60-69

Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays

Marie-Cécile Dufour,^a Séverine Fontaine,^b Josselin Montarry^{a,c} and Marie-France Corio-Costet^{a*}

Abstract

BACKGROUND: Management of grapevine powdery mildew *Erysiphe necator* Schw. requires fungicide treatments such as sterol demethylation inhibitors (DMIs) or mitochondrial inhibitors (Qols). Recently, reduction in the efficacy of DMIs or Qols was reported in Europe and the United States. The aim of the present study was to develop real-time qPCR tools to detect and quantify several *CYP51* gene variants of *E. necator*: (i) A versus B groups (G37A) and (ii) sensitive versus resistant to sterol demethylase inhibitor fungicides (Y136F).

RESULTS: The efficacy of the qPCR tools developed was better than the CAPS method, with a limit of 2 pg for *E. necator* DNA, 0.06 ng for genetic group A and 1.4 ng for the DMI-resistant allele. The detection limits of qPCR protocols (LOD) ranged from 0.72 to 0.85%, and the quantification limits (LOQ) ranged from 2.4 to 2.85% for the two alleles G47A and Y136F respectively. The application of qPCR to field isolates from French vineyards showed the presence of DMI-resistant and/or Qol-resistant alleles in French pathogen populations, linked to genetic group B.

CONCLUSION: The real-time PCR assay developed in this study provides a potentially useful tool for efficient quantification of different alleles of interest for fungicide monitoring and for population structure of *E. necator*.

© 2010 Society of Chemical Industry

Keywords: biotype; DMI fungicide; powdery mildew; Qol; Q-PCR; resistance

1 INTRODUCTION

Grapevine powdery mildew caused by *Erysiphe necator* Schw., an obligate parasite, is one of the most widespread diseases of grapevine (*Vitis vinifera* L.) worldwide. In European and Australian vineyards, two genetic groups of *E. necator*, A and B, have been distinguished.^{1,2} The distribution and epidemiological significance of the two groups are unknown.^{3–7} Based on the overwintering modes, groups A and B may be responsible for the primary inoculum arising from sexual reproduction and/or asexual wintering of mycelium in dormant buds.^{3,8–11} In spring, at the beginning of grapevine growth, symptoms may appear in flag shoot form (asexual) or be caused by ascospore projection (sexual) in sparse plots. The different symptoms have been reported with variable spatial and temporal distribution between the beginning and the end of the growing season, and also depend on the geographical position of the vineyard.^{8,10–14} Indeed, flag shoot symptoms were more frequent in Mediterranean vineyards.^{7,8} As regards flag shoot symptoms at the beginning of the growing season, group A was in the majority, but group B populations were also found alone or mixed in with group A.^{3,11,13} A comparison of life history traits determining aggressiveness between the two genetic groups showed that group A was less aggressive than group B in terms of the germination ratio and infection efficiency, and that group A was more aggressive than group B in terms of the latency period, lesion diameter and number of spores per

lesion.⁷ An association between the levels of disease severity at the end of the growing season and the initial compositions of *E. necator* populations in vineyards was previously observed,^{7,8,11} and damage was found to be greater for epidemics initiated by group B isolates.¹³ Until now, only group B populations have been found to give rise to sexual reproduction in France,^{8,12,14–16} but some studies in Australia and Italy suggest that group A strains can also replicate by sexual reproduction.^{6,17}

Erysiphe necator has been submitted to the pressure of numerous fungicides including sterol biosynthesis inhibitors (SBIs) and, in particular, the sterol C14-demethylase inhibitors (DMIs). The intensive use of DMI fungicides has led to the appearance of resistance in various countries.^{8,18–21} In French vineyards the DMI-resistant isolates belong mainly to genetic group B.^{8,12,22} The DMI resistance has been described as being multigenic, but with one major mechanism involving a single mutation in the

* Correspondence to: Marie-France Corio-Costet, INRA, UMR Santé Végétale 1065, ISVV, Avenue E Bourlaud, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon, France. E-mail: coriocos@bordeaux.inra.fr

a INRA, UMR Santé Végétale 1065, ISVV, Villenave d'Ornon, France

b AFSSA, Lyon, France

c INRA, UR407 Pathologie Végétale, Montfavet, France

14-eburicol demethylase gene (*CYP51*) of *E. necator*.^{23,24} Indeed, in grapevine powdery mildew, the replacement of a phenylalanine residue by tyrosine at position 136 (Y136F) in the *CYP51* gene was associated with a high level of resistance to DMIs,²³ as in *Blumeria graminis* Speer.^{25,26} More recently, resistance to other fungicides such as mitochondrial cytochrome b inhibitors (QoIs) has also been detected in the United States²⁷ and in Europe (Bencené D, private communication, 2007).

Quantitative real-time PCR (qPCR) has recently been applied to the detection and quantification of microorganisms resistant to fungicides.^{27–33} Because it is a very powerful, cultivation-independent, rapid and sensitive method, it has been used to detect various organisms in a wide range of research fields.³⁴ It is especially interesting for non-cultivable, complex environments, and for obligate parasites such as fungi or oomycetes. QPCR methods have also been used to quantify QoI-resistant allele in *B. graminis*,³⁵ in *Plasmopara viticola* Berl. & De Toni^{36–38} and *E. necator*,²⁷ resulting in a single point mutation in the mitochondrial cytochrome b, leading to the replacement of a glycine by an alanine at codon 143 (G143A). Recently, rapid quantification of DMI resistance in *B. graminis* populations has been developed.³²

Nowadays, the tools developed to detect genetic groups or fungicide resistance in *E. necator* are PCR tools based on detection of point mutations in a specific gene such as *CYP51* coding for eburicol-C14-demethylase in sterol biosynthesis,³⁹ β -tubulin gene^{3,13} and transposons,⁴⁰ and on the polymorphism of unknown sequences such as microsatellites (SSR), RAPD, RFLP and AFLP markers.^{1,2,9,10,12,14,41,42}

In spite of the numerous studies carried out on *E. necator*, the detection and quantification of populations resistant to fungicides, as well as the role of the two genetic groups in the development of resistance in pathogen populations, remained unclear. As *E. necator* is an obligate pathogen, knowledge about how its population evolves in the vineyard is difficult to acquire because each symptom must be analysed individually with the PCR tools that currently exist. It is therefore difficult to obtain population data on a large scale. If a tool were available to evaluate the distribution and frequency of DMI-resistant populations or genetic groups quickly and globally, a better understanding of *E. necator* evolution under different selection pressures might be gained.

The aim of the present study was to develop a DNA diagnostic tool based on real-time allele-specific PCR using the fluorescent dye SYBR-Green: (i) to identify and quantify the presence of allele-specific mutation linked to a high level of resistance to DMI fungicide; (ii) to identify and quantify both genetic groups A and B; (iii) to obtain data about the distribution of genetic groups and fungicide resistance of *E. necator* in French vineyards. A rapid test would allow more accurate assessment of resistance and epidemic risk with a view to optimising integrated pest management.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *Erysiphe necator* material and sampling

Powdery mildew isolates ($N = 11$) used to develop the qPCR method came from a laboratory collection (Table 1). Monoconidial isolates were inoculated under sterile conditions on decontaminated grape leaves (cv. Cabernet Sauvignon) in Petri dishes, as described in a previous article.⁵ Leaves were placed at the bottom of a Plexiglas settling tower, and conidia were blown in at the top from sporulating leaves (1000–1500 conidia cm^{-2} of leaf). Inoculated leaves were incubated for 12–14 days at 22 °C

Table 1. Characteristics of *Erysiphe necator* isolates used in this study

Strain ^a	Origin	Genotype	DMI status
TOU 01	Languedoc-Roussillon, France	A	Sensitive
ROU 08	Languedoc-Roussillon, France	A	Sensitive
PVR 43	Languedoc-Roussillon, France	A	Sensitive
PVR 15	Languedoc-Roussillon, France	A	Sensitive
PVR 33	Languedoc-Roussillon, France	A	Sensitive
LAT 12	Aquitaine, France	B	Sensitive
CHL 02	Aquitaine, France	B	Sensitive
GF 10	Aquitaine, France	B	Sensitive
IBA 11	Bangalore, India	B	Resistant
HU3, HU1	Eger, Hungaria	B	Sensitive

^a All isolates were sensitive to QoI fungicide except isolates HU1 and HU3 which were strobilurin resistant.

with a 16 : 8 h light : dark photoperiod. Fungal material growing on the leaf surfaces was scraped into Eppendorf tubes, dried and stored at –20 °C.

Sampling was conducted in French vineyards from May to the beginning of October, with $N = 52$ in 2008 and $N = 59$ in 2009, in six grapevine production regions. Totals of 689 and 720 grapevine lesions were collected over the 2 years. For each sample, 10–15 lesions from leaves (6 mm diameter) were collected and pooled as a sample for each locality. The mycelium of *E. necator* on grape berries was scraped from 15 bunches, pooled in Eppendorf tubes and stored at –20 °C.

2.2 DNA isolation

Total DNA isolated from frozen tissue samples or directly from lesions (infected leaf discs) collected in the vineyards without subculture was extracted with chloroform + isoamyl alcohol, followed by isopropanol precipitation as previously described.⁴³ After mixing with an equal volume of isopropanol, the DNA pellet was incubated for 2 h at –20 °C, then precipitated by centrifugation for 10 min at 4 °C and $12\,000 \times g$. After washing with 70% (v/v) ethanol, the DNA pellet was dried and dissolved in water. The DNA concentration was measured by absorbance at 260 and 280 nm (Genequant Pro; Amersham Bioscience, France). DNA extracts were stored at –20 °C.

2.3 CAPS method

A single nucleotide polymorphism (SNP) created a recognition site of restriction endonuclease *AccI* that allowed the characterisation of A or B isolates by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) analysis according to the semi-quantitative method previously described.^{3,7} Polymerase chain reactions (PCRs) were performed in a 16.5 μL volume containing 1.5 μL of the stock genomic DNA solution diluted 1/3, 1.5 μL of $10\times$ PCR buffer (Eurogentec, France), 1.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM of each dNTP, 0.2 μM of each primer (EN-TUB) (Table 2) and 0.25 U of Taq SilverStar DNA polymerase (Eurogentec). The PCR programme was performed as follows: a first denaturation step of 3 min at 95 °C, followed by 38 cycles of 40 s at 95 °C, 55 s at 58 °C, 55 s at 72 °C and a final elongation step of 5 min at 72 °C. Cleaving reactions were performed in a 10 μL volume with 2 μL of PCR product, 1 μL of $10\times$ buffer No. 4 (BioLabs) and 1.5 U of *AccI* enzyme (BioLabs) at 37 °C for 1.5 h. Restriction fragments were visualised on 2% agarose after staining with ethidium bromide.

Table 2. Primer sequences used in this study

Primers	Sequences (5'–3') forward	Sequences (5'–3') reverse	Gene	Genbank accession number	Nt position	Fragment (bp)
qEN	CTTCGGATTTTGGGTCAGA	GGCAGATCATTGGATTCTT	Cyp51	AF042067	1310–1157	153
qEN 37A	GGGTGGATTTTCATGGTCAC	GCAACTGGCTCAATACATT TAACA	Cyp51	AF042067	88–166	79
qEN 136R	TGGGAAGTTAAAAGATGTCA ACG	TGAGTTTGGAAATTGGACA ATCAA	Cyp51	AF042067	418–518	100
qEN 143S	ACCTACTTAAAGCTTTAGAA GTTTC	TACGGGCAGATGAGCCTAT GCGG	Cyt b			
qEN 143R	ACCTACTTAAAGCTTTAGAA GTTTC	TACGGGCAGATGAGCCTAT GCC	Cyt b			
EN-TUB	GCGAGATCGTAAGCTTGACAC	GGCAGGAGGAACGTATTGT	β -Tubuline	AY074934	38–486	449

2.4 Primers

Primers for the reference *Erysiphe necator* (EN) and specific alleles (for genetic group G37A, and Y136F for DMI resistance) for real-time PCR were designed with Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu>) to be used at the same hybridisation temperature and MgCl₂ concentration. Primer pairs were designed in order to detect and quantify different specific alleles (Table 2). They produced allele-specific fragments free of primer dimers or non-specific product contaminants. Two sets of primers consisted of those that were designed to amplify *E. necator* in *CYP51* gene: qEN37A for allele specific to genetic group A, and qEN136R for allele specific to DMI resistance (Table 2). To quantify Qol-resistant allele (G143A), qEN 143S and qEN 143R, two primers previously described by Baudoin *et al.*,²⁷ were used. To define the optimal annealing temperature and to test the specificity of the primers, PCR gradients were performed in an Eppendorf thermocycler. DNA samples (100–200 ng) were amplified. Twenty-five microlitre PCRs containing 0.1 μ M of primers, 1 mM of MgCl₂, 0.3 mM of each dNTP and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Eurogentec, France) were carried out. PCRs were performed using the following amplification parameters: initial preheating at 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at variable temperatures (from 55 to 65 °C) for 20 s, extension at 72 °C for 20 s and a final extension at 72 °C for 10 min. The specificity was analysed in a 2% agarose gel in Tris borate EDTA buffer (0.5 M) and by direct sequencing of amplified PCR products (data not shown). They produced allele-specific fragments free of primer dimers or non-specific product contaminants. All primers were tested out on pure isolates that were either 100% genetic group A or 100% group B for the development of q-PCR for the genetic group, and on isolates that were either 100% sensitive or DMI resistant for the development of q-PCR for DMI resistance.

2.5 Real-time PCR protocol

Real-time qPCR reactions were assembled in a 14 μ L reaction volume containing 7 μ L of Absolute™ QPCR SYBR® Green mix containing thermo-start® DNA polymerase and buffer (Abgene, France), 5 μ L of DNA templates and 1 μ L of each primer (10 nM), according to the manufacturer's protocol. Each sample was assayed at least in duplicate. PCR reactions were performed in a real-time thermal iCycler iQ (Bio-RAD, Hercules, CA). Three-step PCR amplification was carried out using SYBR® Green fluorescent dye detection under the following conditions: initial preheating at 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 30 s and at the

primer T_m for 1 min (56 °C for genotype primers qEN and qEN37A, 58 °C for DMI primers qEN136 or 60 °C for Qol primers) with a final extension at 72 °C for 20 s. Increase in the fluorescent emission signal from SYBR Green was recorded at the end of the elongation phase at 72 °C for each cycle without signal normalisation. The absence of unwanted products was confirmed by automated melting curve analysis with a temperature increase of 0.5 °C.

2.6 PCR efficiency

To ensure correct normalisation in real-time PCR, amplification efficiencies should be similar. Each PCR system was tested with *E. necator* DNA samples (20 ng μ L⁻¹), which were serially diluted in 1 : 10 ratios with distilled water. Amplification efficiencies should be determined from the slope of the log-linear portion of the calibration curve. Specifically, PCR efficiency = $10^{-1/\text{slope}} - 1$, when the logarithm of the initial template concentration of known DNA amounts (the independent variable) is plotted on the x-axis and C_q (the dependent variable) measured by the iCycler™ iQ software (Bio-RAD, Hercules, CA) is plotted on the y-axis.

2.7 Real-time quantitative PCR optimisation

Standard calibration curves were constructed with a range of allele-specific frequencies (from 0.36 to 100% of B versus A genetic group, or sensitive versus DMI resistant) using the specific DNAs for the respective alleles. The experiment was performed 3 times and conducted on the three different SNPs. The specific allele was expressed as the relative quantity in relation to an allele common to two genetic groups (EN for *Erysiphe necator*), which was used as an internal calibrator. The difference between the two PCR reactions (ΔC_q) was used to calculate the allele frequency according to the direct correlation between ΔC_q ($\Delta C_q = C_{q \text{ allele specific}} - C_{q \text{ EN}}$) and the decimal logarithm of allele-specific frequency. The logarithm of the known allele frequency was plotted as a function of the ΔC_q measured between the two PCR reactions, and a trend line was estimated. To test the linearity of SNP allele quantification, ΔC_q values were used for linear regression analysis. In parallel, a validation method based on determination of the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) was used in order to avoid the occurrence of false positives.³⁴ By assuming the normal distribution of measured ΔC_q values, LOD and LOQ were calculated from the residual standard deviation of the linear regression data according to $\text{LOD} = 3 \times (S_{xy}/b)$ and $\text{LOQ} = 10 \times (S_{xy}/b)$, where S_{xy} is the residual standard deviation and b is the slope of the linear regression equation.

In a second assay, the same concentrations of *E. necator* DNA ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) were serially diluted ($1:1$, $1:10$, $1:10^2$, $1:10^3$) in *Vitis vinifera* DNA ($60 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) to investigate any possible influence of host DNA on amplification of pathogenic DNA. The experiment was performed twice. Foliar discs contaminated with each genotype (i.e. A or B) were used to test a range of mixes, e.g. three foliar discs of A genotype and seven foliar discs of B genotype, giving 30% of genotype A in the mixed sample. DNAs were isolated as previously described. The ΔC_q values of samples taken as unknown were then used to calculate the allele frequency according to the trend line equation obtained previously. The correlation between known and measured allele-specific frequencies obtained for each SNP was established.

3 RESULTS

3.1 Establishment of a real-time PCR system for SNP quantification

PCR efficiencies were similar for the EN reference, 37A and 136R specific allele PCR assays, at 1.23, 1.22 and 0.99 respectively,

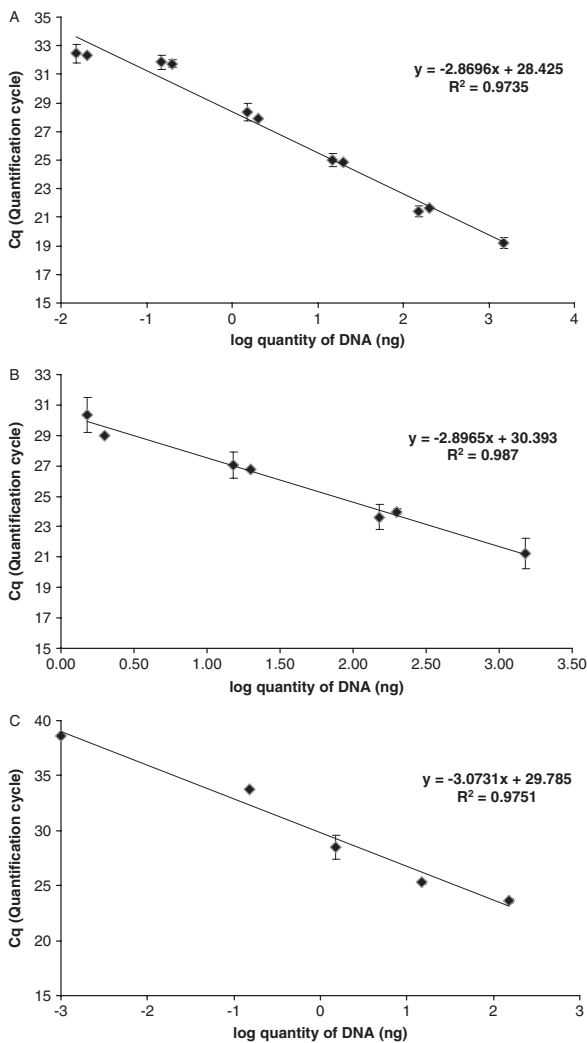


Figure 1. PCR efficiencies by plotting the quantification cycle (C_q) versus the amount of log quantity of template DNA (ng) for *Erysiphe necator*. A: efficiency for *E. necator* specific allele (q-EN); B: efficiency for group A specific allele (q-EN-37A); C: efficiency for DMI-resistant allele (q-EB-136R). PCR efficiency = $10^{-1/\text{slope}} - 1$.

and they were derived from the slope of the standard curves (Fig. 1). The C_q (quantification cycle) values ranged from 19 to 32 for reference *E. necator* primers (EN) (Fig. 1A), from 21 to 30 for genetic group A allele-specific primers (37A) (Fig. 1B) and from 23 to 38 for DMI-resistant allele-specific primers (136R) (Fig. 1C). Values over 32, 30 and 38, respectively, for EN, 37A and 136R were considered as negative (false positive). The C_q values corresponded to a detection limit of 2 pg of *E. necator* DNA, 0.06 ng of genetic group A DNA and 1.4 ng of DMI-resistant DNA according to specific calibration curves for DNA samples (Fig. 1).

3.2 LOD and LOQ values and validation

Regression coefficients of calibration curves (Fig. 2) were 0.983 and 0.986, and residual standard deviations S_{xy} were 0.679 and 0.890 for group A allele-specific 37A (Fig. 2A) and DMI-resistant allele-specific 136R (Fig. 2B) primer sets respectively. High correlations were found between allele-specific frequencies and ΔC_q values. The absolute LOD values calculated from residual standard deviations of the linear regression data of 37A and 136R alleles were 0.72 and 0.85% respectively, and the LOQ values were 2.40 and 2.85% for 37A and 136R alleles respectively. In addition, the LOD and LOQ values of QoIs for the 143R allele were 1.04 and 3.49% respectively (data not shown).

The frequencies measured on pooled DNA samples were also compared with 'known' frequencies and were well correlated for group A and DMI-resistant specific alleles, with $R^2 = 0.967$ and 0.990 respectively (data not shown). Finally, allele frequencies from the pooled samples were determined by qPCR and compared with those obtained by the CAPS method. On agarose gel, the

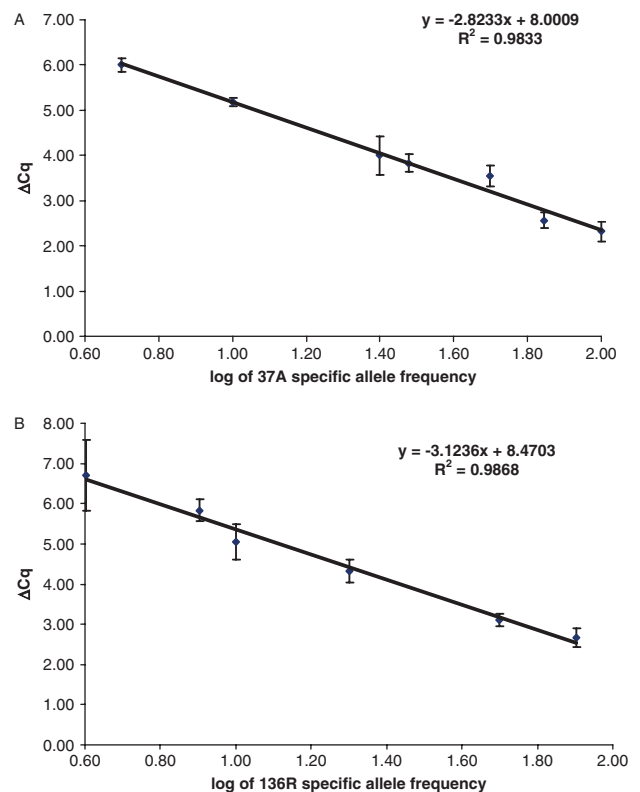


Figure 2. Linear relationship between the frequency of genetic group A allele qEN-37A (A) or DMI-resistant allele qEN-136 (B) in *Erysiphe necator* and ΔC_q values determined with real-time PCR assays.

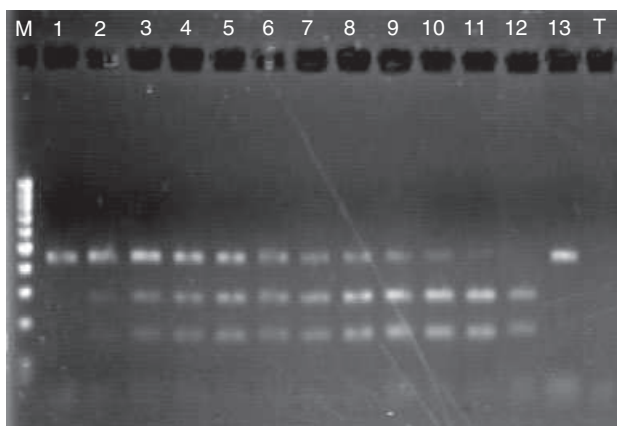


Figure 3. Cleaved PCR fragments obtained from 13 DNA samples containing different ratios of genetic groups A and B. Lane M contains molecular marker (100 bp ladder); lanes 1 and 13: 100% of genetic group A showing a unique fragment of 449 bp; lanes 2 to 10: different ratios of group A (90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 and 10%) mixed with group B; lanes 11 and 12: 100% of genetic group B; lane T contains a water control (no DNA).

Table 3. Distribution of genetic group A specific allele and DMI-resistant allele of *E. necator* in various French vineyard regions in 2008

Region	N	Mean percentage of G37A allele (group A) (\pm SEM)	Mean percentage of Y136F allele (DMI resistant) (\pm SEM)
Aquitaine	6	0(\pm 0)	0(\pm 0)
Burgundy	7	0.8(\pm 0.80)	5.51(\pm 3.49)
Champagne-Ardennes	6	0.96(\pm 0.96)	0(\pm 0)
Languedoc-Roussillon-1	6	11.06(\pm 7.27)	0(\pm 0)
Languedoc-Roussillon-2	10	75.13(\pm 11.84)	1.43(\pm 1)
Midi- Pyrénées-1	10	10.17(\pm 6.86)	0(\pm 0)
Midi-Pyrénées-2 ^a	5	1.16(\pm 1.16)	18.77(\pm 18.82)
PACA	2	9.39(\pm 6.25)	2.62(\pm 2.62)
National average	52	18.37(\pm 4.73)	2.92(\pm 1.87)

^a Only Midi-Pyrénées-2 region showed Qol-resistant alleles with a mean of 5.16 \pm 5.67%. The national average was 0.6 \pm 0.6%.

presence of a specific band (449 pb) of group A was detected in mixtures containing from more than 10% to 100%, and conversely for the group B. The different proportions of the two alleles were observed in mixtures but could not be estimated exactly (Fig. 3). In parallel, these same mixtures considered as unknown samples were tested with the present qPCR method. The values of frequencies measured were totally correlated with the theoretical values, with a correlation coefficient of 0.977 (data not shown). Comparison of both methods by analysis of field samples, either of pooled samples (q-PCR) or of an average of 10 individual samples (CAPS), showed no significant difference ($P = 0.925$) for percentages of allele above 29% (data not shown).

3.3 Frequency of group A allele in field populations of *E. necator*

To assess the importance of genetic group A distribution in French vineyards, 52 and 59 field samples were typed in 2008 and 2009 in this study (Tables 3 and 4). In 2008, 18.37% of field samples were

Table 4. Distribution of genetic group A specific allele and DMI-resistant allele of *Erysiphe necator* in various French vineyard regions in 2009

Region	N	Mean percentage of G37A allele (group A) (\pm SEM)	Mean percentage of Y136F allele (DMI resistant) (\pm SEM)
Aquitaine	2	0(\pm 0)	12.26(\pm 12.30)
Burgundy	13	1.53(\pm 0.63)	1.06(\pm 0.95)
Champagne-Ardennes	3	4.21(\pm 4.21)	37.27(\pm 31.44)
Languedoc-Roussillon-1	13	24.08(\pm 10.93)	11.77(\pm 7.63)
Midi-Pyrénées-2 ^a	24	0.35(\pm 0.26)	33.40(\pm 8.44)
Rhône-Alpes	4	8.89(\pm 8.86)	13.67(\pm 11.13)
National average	59	6.60(\pm 2.71)	19.65(\pm 4.49)

^a Only the Midi-Pyrénées region exhibited Qol-resistant allele with a mean of 23.18 \pm 8.0%. The national average was 9.43 \pm 3.61%.

quantified as genetic group A, but only 6.60% in 2009 (Tables 3 and 4). Nationwide, for the total sampling carried out in 2008 and 2009, a mean of 12.14% of these samples was group A and a mean of 87.89% was group B (Table 5). The frequencies of group A ranged from 0 to 100%, with variability depending on the samples and on vineyard areas (Tables 3 to 5). In 2008 only the samples from area LR2 ($P < 0.0001$) and in 2009 those from area LR1 ($P < 0.02$) were significantly different from those of other areas, with 75.13 and 24.08% of group A present (Tables 3 and 4, Fig. 4A). The variability observed in LR areas in 2008 and 2009 is related to the earliness of the samplings ($P < 0.0001$) and the organ considered. This was reinforced by the entirety of samples obtained from leaves, where a significantly higher frequency of group A (17.35%, $P = 0.028$) than that collected on grape berries (5.47%) was found (Table 5).

With regard to the samples from Mediterranean vineyards in 2008 and 2009, such as the Languedoc-Roussillon (LR1, LR2) and PACA (PA) regions, it was remarked that these regions exhibited a significantly higher frequency of group A than other areas, with an average of 37.08%, and only 2.44% in other regions ($P < 0.0001$) (Table 5, Fig. 4A).

3.4 Frequency of DMI-resistant allele and Qol-resistant allele in the field population of *Erysiphe necator*

A total of 111 samples collected in 2008 and 2009 were used to assess the presence of specific allele involved in DMI resistance (Y136F) (Fig. 4B) and in Qol resistance (G143A) (Fig. 4C). In 2008, out of 52 samples assessed, only ten showed the presence of Y136F DMI-resistant allele in French vineyards, and the allele was significantly quantified in seven samples, with a mean percentage of 2.92% (Table 3). Only two samples, from the Burgundy and Midi-Pyrénées areas, exhibited a high frequency of DMI-resistant allele: 25.07 and 93.85% respectively. In 2009, among 59 samples, the Y136F allele was detected in 32 samples, with a mean percentage of 19.65% in all areas (Table 4), with a marked presence in the Midi-Pyrénées (MP2), where nine samples with more than 50% of DMI-resistant allele were found. During the 2 years, the mean percentage of Y136F allele found in different regions increased from 2.92% in 2008 to reach 19.65% in 2009. Nationwide for the 2 years, 11.81% of samples had the DMI-resistant allele, and 88.19% had the sensitive allele at position 136, with unequal distribution into various regions (Table 5, Fig. 4B). A significant difference was found in the regions at a threshold of 5% ($P = 0.006$), but not in

Table 5. Mean distribution of specific alleles for DMI resistance, QoI resistance and genetic group A of *Erysiphe necator* in French vineyard regions in 2008–2009

Region	N	Mean percentage of G37A allele (group A) (\pm SEM)	Mean percentage of Y136F allele (DMI resistant) (\pm SEM)	Mean percentage of G143A allele (QoI resistant) (\pm SEM)
Aquitaine	8	0(\pm 0)	3.07(\pm 3.05)	0(\pm 0)
Burgundy	20	1.53(\pm 0.48)	1.06(\pm 1.36)	0(\pm 0)
Champagne-Ardennes	9	2.04(\pm 1.47)	12.42(\pm 10.99)	0(\pm 0)
Languedoc-Roussillon-1	19	19.47(\pm 8.03)	8.06(\pm 5.45)	0(\pm 0)
Languedoc-Roussillon-2	10	75.13(\pm 11.85)	1.43(\pm 1.00)	0(\pm 0)
Midi-Pyrénées-1	10	10.17(\pm 6.86)	0(\pm 0)	0(\pm 0)
Midi-Pyrénées-2	29	0.49(\pm 0.28)	30.88(\pm 7.63)	20.25(\pm 6.79)
PACA	2	9.39(\pm 6.25)	2.62(\pm 2.62)	0(\pm 0)
Rhône-Alpes	4	8.86(\pm 8.86)	13.67(\pm 11.13)	0(\pm 0)
National average	111	12.11(\pm 2.69)	11.81(\pm 2.65)	5.29(\pm 1.98)
Mediterranean vineyards (LR, PA)	31	37.08(\pm 2.69)	5.57(\pm 3.28)	0(\pm 0)
Outside Mediterranean vineyards (A, B, CA, RA, MP)	80	2.44(\pm 1.01)	14.24(\pm 3.42)	12.50(\pm 3.42)
Leaf samples	62	17.35(\pm 4.45)	13.48(\pm 4.04)	9.05(\pm 3.16)
Grape berries samples	49	5.47(\pm 2.05)	4.24(\pm 2.73)	15.28(\pm 4.48)

the Mediterranean area ($P = 0.143$) or in the organs, i.e. leaves or berries ($P = 0.245$), and no sample belonging to 100% group A exhibited the DMI-resistant allele.

Allele-specific G143A qPCRs were performed as described by Baudoin *et al.*²⁷ and enabled the presence of QoI resistance in French vineyards to be detected for the first time in 2008. Only one sample from the MP2 area, which is already highly resistant to DMI (93.85%), exhibited QoI-resistant allele (30.99%), leading to 0.6% of QoI-resistant allele in 2008 at the nationwide level (Table 3). In 2009, the G143A allele involved in QoI fungicide resistance was detected in 11 samples with a mean of 9.43% (Table 4), all coming from the Midi-Pyrénées region (MP2) as in 2008. It was noticed, as in 2008, that samples exhibiting QoI-resistant allele frequently showed DMI-resistant allele (8/11). Overall, nationwide for the 2 years, the mean percentage of QoI-resistant allele detected reached 5.29% (Table 5, Fig. 4C).

4 DISCUSSION AND CONCLUSION

The primers developed here were able to amplify DNA of *E. necator* and to identify genetic group A and DMI-resistant alleles. With qPCR assays it is thus possible to detect and quantify group A and DMI-resistant populations under the 10% detection limit of the CAPS method, with quantification limits of 2.40 and 2.85% and detection limits of 0.72 and 0.85% respectively. Several genotype quantifications can be specified on the same sample or population, such as genetic group A or B, DMI resistance and QoI resistance frequencies.

These quantitative methods could be used for dynamic population studies to measure the genetic group evolution of *E. necator* throughout the growing season, and to monitor resistance to DMI and QoI fungicides in the vineyard. In the case of an obligate parasite such as *E. necator*, being able to identify and quantify pooled samples represents a real step forward for monitoring vineyard populations of the pathogen.

4.1 A/B ratios and geographic distribution

For genetic group determination, a qualitative test exists for screening field population by nested PCR or CAPS

methods,^{3–14,16,22} but quantitative tests need many samples with individual genotype determination. The method developed here was initially designed as an alternative to traditional quantitative and qualitative tests, and qPCR analysis of group A and B mixtures showed a better sensitivity than the CAPS method. The A/B ratios observed in the 111 field samples were variable, with an average of 12.11% of group A and 87.89% of group B (Table 5, Fig. 4A). Thus, in French vineyards, group B is predominant, with its proportion varying according to region, organ (leaves/berries) and time of collection.

It was noted that there were important variations in allele frequencies within a region and between regions. Concerning the allele of group A, part of the variability is due to the date of collection and to the organ harvested. Indeed, samples collected at the beginning of the season are significantly richer in group A than in populations collected later ($P < 0.0001$), in particular in vineyards where group A is present (LR, PACA, RA, MP1). This is also related to the ecological requirements of genotype A, which appears early, at the beginning of the growing season. For example, in 2008, in the Languedoc-Roussillon-2 area, samples harvested early were significantly different from those from other areas ($P = 0.0001$), with 75.13% in group A. On the other hand, the samples from the Languedoc-Roussillon-1 area in 2008, collected 2 months later, exhibited only 11.06% in group A. Although the samples did not come from the same plot, as described in a previous article, group A isolates appear to be prevalent more at the beginning of the growing season and then tend to decrease in the vineyard as the season moves on, to the benefit of group B,^{8,11,13} before preparing to overwinter in dormant buds of the grapevine. Globally, group A was prevalent more on leaves (17.35%) than on grape berries (5.47%) (Table 5), suggesting that group A isolates are less aggressive on berries than group B isolates, as reported for other genetic groups of fungus such as *Botrytis cinerea* Pers.⁴⁴ This result is in agreement with previous studies describing group A as less aggressive than group B,^{13,14} or group A as less prevalent in grape berries than group B.^{11,12} This reinforces the hypothesis that the two groups could have different ecological requirements,⁷ and that the fungicide pressure exerted on group A was less important than on genetic group B which was present throughout the growing season. In previous studies,

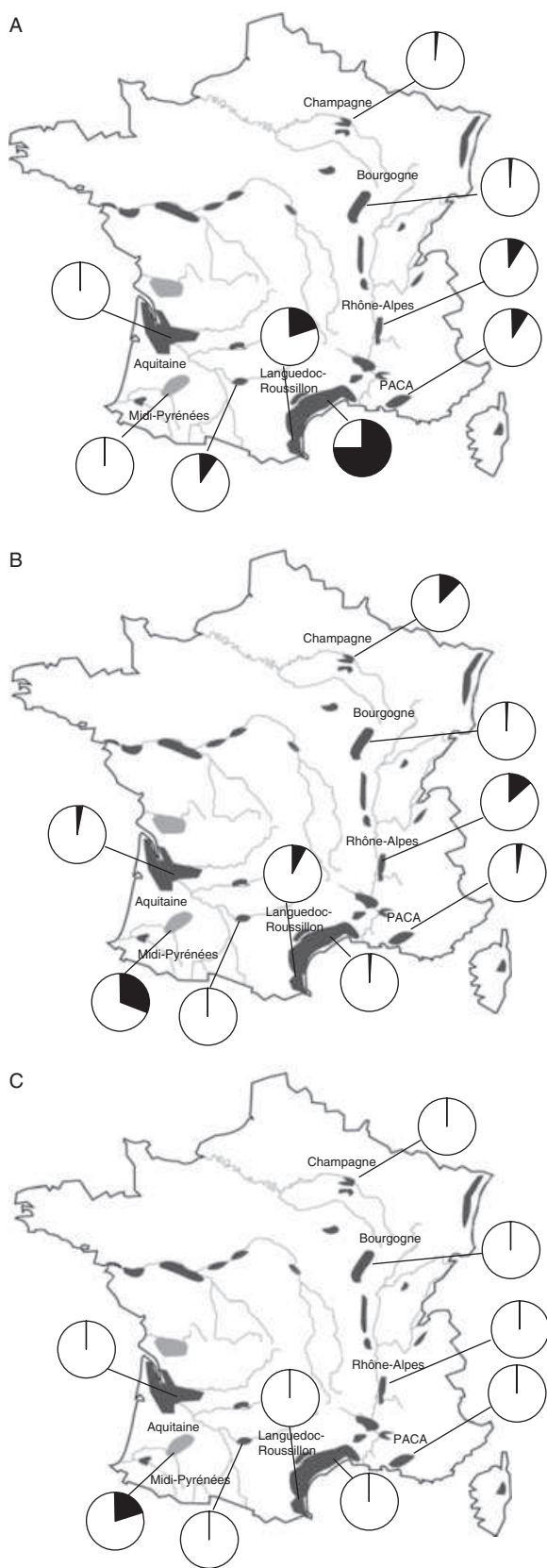


Figure 4. Comprehensive mean distribution of specific alleles of *Erysiphe necator* genetic group A (A), DMI resistant (B) and Qol resistant (C), in different vineyard regions.

group A seemed to be prevalent more in Mediterranean areas than in other areas.^{1,8,13} The qPCR assays here showed that the areas bordering the Mediterranean Sea exhibit a significantly higher frequency of group A (37.08%) than other areas (2.44%, Table 5). This suggests the possibility of a geographical variation in the population structure of *E. necator* owing to climatic factors and/or the sensitivity of local cultivars to grapevine powdery mildew.

4.2 Fungicide-resistant allele distribution

Determination of fungicide sensitivity in pathogen population and which genetic group is involved is the first important step in management of fungicide resistance. The most commonly used test for determining DMI sensitivity of *E. necator* isolates was a biological test involving mycelium growth inhibition. This required biological tests to be conducted at one or several concentrations and was very fastidious, in particular with an obligate parasite such as *E. necator*. After this came the nested PCR method, used to detect DMI resistance based on Y136F, but it was not quantitative.³⁹ The present method was therefore designed to be able to quantify the proportion of a resistant allele in a population, with the possibility of pooling samples. The resistant allele Y136F exhibited a national average of 11.81%, which strengthens the idea that the DMI resistance of grapevine powdery mildew in French vineyards is limited. However, the status can be very contrasted, with some plots showing 100% of DMI-resistant allele and others 0%. The present authors would therefore suggest that the variability observed with resistant alleles 136F and 143A could essentially be the result of the strength of the epidemic, and genetic variability, as well as the choice of fungicide treatment and cultivation practices. Thus, plots where vines are close together can present very different frequencies of the specific alleles. In addition, sexual reproduction may also play an important part in the spread of resistant alleles, depending on the sexual capacity of the genetic group.

DMI resistance was not strictly monoallelic, and various studies have shown the polygenic aspect of this fungicide resistance, involving: (i) mutation of the DMI target enzyme 14 α -demethylase CYP51,^{23,25,26,45} (ii) overexpression of the CYP51 gene,^{45–50} (iii) overexpression of ATP binding cassette (ABC) transporters coding for efflux pumps,^{51,52} (iv) unknown mechanisms conferring weak resistance.^{8,12,53,54} However, for an obligate pathogen such as powdery mildew, the major mutation in position 136 or its equivalent has been described,^{23,25,26} even if other minor mechanisms may coexist.^{12,22} The qPCR assay can be used for detection and quantification of resistant Y136F allele in *B. graminis*, another powdery mildew.³² A method to determine the development of fungicide resistance in grapevine powdery mildew populations is a basic step in being able to predict possible trends in fungicide resistance on a large scale. The qPCR assay described in this study is applicable for high-throughput detection of the resistant Y136F allele in more than 100 populations. As cross-resistance is widespread between triadimenol, triadimefon, propiconazole, tebuconazole and cyproconazole^{12–22} in MP2 populations, where the frequency of 136Y increased from 18.77% in 2008 to 33.40% in 2009, the authors would suggest that these fungicides cannot control the disease everywhere, in particular in six plots where the resistant allele was present at more than 90%. In this event, a fungicide with a mode of action other than sterol demethylase inhibitor would be required. More alarmingly, in some populations in the Midi-Pyrénées (MP2), resistance was also found to a QoI fungicide, which acts on cytochrome b, a mitochondrial respiration target,⁵⁵ combined with DMI-resistant

Table 6. Mean distribution of alleles specific to DMI and QoI resistance, depending on the percentage of group A of *Erysiphe necator*

Group A classes	Percentage (\pm SEM) ^a	
	DMI allele	QoI allele
0–15%	37.72(\pm 7.28) a	41.93(\pm 12.61) a
15–85%	15.34(\pm 8.42) b	0(\pm 0) b
85–100%	0(\pm 0) c	0(\pm 0) b

^a a, b, c: significantly different at a threshold of 0.05%.

allele. This suggests that fungicides may be selecting double resistance in *E. necator* populations. This is the first report on double fungicide resistance in grapevine powdery mildew and, following the development of double resistance in populations of *E. necator*, should be of interest for controlling epidemics and the spread of resistant alleles in relation to nuclear or mitochondrial heritability. The different tools reported here would be very beneficial for *E. necator* management. It would be interesting to monitor the evolution of the sensitivity of the Midi-Pyrénées-2 plot for several years and to modify the treatment programme, which has systematically consisted in four DMI and two QoI treatments per growing season. The monitoring carried out in 2009 corroborates the double resistance found in 2008, with seven detections of the two resistant alleles (Y136F and G143A).

The possibility of combining quantification of resistant alleles with the presence of genetic group A or B could throw light on the role played by the genetic group in the development of resistance in relation to the biological characteristics of the two groups, and could also improve pest management. Indeed, genetic group A, which is more prevalent in Mediterranean vineyards, might winter in the dormant buds but without sexual reproduction in France.^{12,14–16} Moreover, group A isolates were significantly more sensitive to the different fungicides than group B isolates in the absence of specific DMI-resistant allele or QoI-resistant allele.^{8,12} Indeed, the present authors have previously shown that the sensitivity baseline of monoconidial isolates to DMIs, quinoxifen and azoxystrobin was significantly different in the two genetic groups A and B, with differential factors between groups A and B of 15.6, 4.7 and 3.5 for triadimenol, penconazole and tebuconazole DMI fungicides. The study carried out on isolates of group A or B having never been handled with quinoxifen and QoI fungicides also showed a difference of a factor 2 between the two groups, with the group B less sensitive than the group A. The results of the present study support previous work on the difference in fungicide sensitivity of the two genetic groups A and B. Indeed, populations exhibiting alleles resistant to fungicides belonged in the majority to group B. Thus, populations exhibiting less than 15% of group A had the strongest mean percentage of resistance (37.72%), and those containing 15–85% or 100% of group A showed only 15 or 0% of resistant allele respectively (Table 6). As regards QoI resistance, only populations exhibiting 100% of group B showed QoI resistance, with a mean of 41.93%. These results reinforced the role of group B in the resistance of fungicides in populations of *E. necator*.

This new diagnostic method has numerous advantages: (i) the method is not based on expensive fluorescent labelled primers or probes; (ii) it is a tried and tested assay that requires no post-PCR processing (RFLP or nested PCR); (iii) it promises to be time saving and precise enough to allow detection of weak genetic

associations; (iv) it can serve to estimate genetic variability on a large scale owing to the possibility of working with pooled samples versus individual symptoms. Moreover, this is the first study to offer a wide overview of *E. necator* diversity in French vineyards more easily than nested PCR or CAPS on individual samples. From now on, it will be possible to specify the distribution of the various genetic groups and to test different hypotheses. Furthermore, early detection of resistant alleles at low frequency, coupled with risk evaluation, would allow implementation of antiresistance strategies in order to prolong the cost effectiveness and lifetimes of fungicides. This q-PCR assay can help wine growers to manage fungicide treatments and reduce the risk of appearance of resistance and its spread. Indeed, knowing which genetic groups are present at the beginning of the season (A and/or B) will allow them to adjust the use of QoI or DMI fungicides. An assessment of the sensitivity of a vineyard plot in year *N* will mean anticipation for year *N* + 1 and the choice of a more appropriate treatment programme. In addition, in France, for example, out of 30 approved chemical compounds, 14 contain a DMI and six contain a QoI fungicide. There is not much leeway, and proper management of the risk of resistance becomes essential. The frequencies of the different specific alleles could be used to integrate pest management in vineyards and to obtain a better understanding of the role of groups A and B. This would help in obtaining a more accurate assessment of exposure to genetic variability in vineyards nationwide and throughout the growing season. In particular, knowledge of how long it takes for populations to move from being sensitive to becoming resistant with loss of fungicide efficacy is important for well-directed fungicide resistance management programmes. The assay could prove useful in the routine monitoring of pest management in vineyards, which would in turn provide timely warning for wine growers.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to Prof. D Bencené (Czech Republic), SRAL, FREDON staff and P Cartolaro (France) for providing samples from different localities. They thank especially A Micoud and J Grosman from Lyon SRAL, for their help in developing this programme and INRA and the Regional Council of Aquitaine for financial supports.

REFERENCES

- Délye C, Laigret F and Corio-Costet MF, RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. *Phytopathol* **87**:670–677 (1997).
- Evans KJ, Whisson DL, Stummer BE and Scott ES, DNA markers identify variation in Australian populations of *Uncinula necator*. *Mycol Res* **101**:923–932 (1997).
- Amrani L and Corio-Costet MF, A single nucleotide polymorphism in the beta-tubulin gene distinguishing two genotypes of *Erysiphe necator* expressing different symptoms on grapevine. *Plant Pathol* **55**:505–512 (2006).
- Cortesi P, Pizzati C, Bertocchi B and Milgroom MG, Persistence and spatial autocorrelation of clones of *Erysiphe necator* overwintering as mycelium in dormant buds in an isolated vineyard in northern Italy. *Phytopathology* **98**:148–152 (2008).
- Délye C and Corio-Costet MF, Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*: RAPD analysis discriminates two biotypes. *Mycol Res* **102**:283–288 (1998).
- Miazzini M, Hajjeh H and Faretra F, Observations on the population biology of the grape powdery mildew fungus *Uncinula necator*. *J Plant Pathol* **85**:123–129 (2003).

- 7 Montarry J, Cartolaro P, Delmott F, Jolivet J and Willocquet L, Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during grapevine powdery mildew epidemics. *Appl Environ Microbiol* **74**:6327–6332 (2008).
- 8 Corio-Costet MF, *Erysiphe necator*. Monograph, Tec/Doc Lavoisier, Paris, France, 132 pp. (2007).
- 9 Cortesi P, Ottaviani MP and Milgroom MG, Spatial and genetic analysis of flag shoot subpopulations of *Erysiphe necator* in Italy. *Phytopathology* **94**:554–550 (2004).
- 10 Miazzi M, Hajjeh H and Faretra F, Occurrence and distribution of two distinct genetic groups in populations of *Erysiphe necator* Schw. in southern Italy. *J Plant Pathol* **90**:563–573 (2008).
- 11 Corio-Costet MF, Délye C, Stievenard C, Douence L and Ronchi V, Biodiversity fungicide resistance of grape powdery mildew. Proceedings of Meeting on Integrated Control in Viticulture, Florence, Italy, March 1–4, 1999. *Bull OILB/SROP* **23**:33–36 (2000).
- 12 Corio-Costet MF, Bouscaut J, Delmotte F, Douence L, Richart-Cervera S and Amrani L, Genetic structure of powdery mildew and fungicide resistance: AFLP and molecular tools of detection. *7th ANPP Int Conf Plant Diseases*, France, 3–5 December 2003, pp. 1–8 (2003).
- 13 Montarry J, Cartolaro P, Richard-Cervera S and Delmotte F, Spatio-temporal distribution of *Erysiphe necator* genetic groups and their relationships with disease levels in vineyards. *Eur J Plant Pathol* **123**:61–70 (2009).
- 14 Peros JP, Troulet C, Guerriero M, Michel-Romiti C and Nottoghem JL, Genetic variation and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, in southern France. *Eur J Plant Pathol* **113**:407–416 (2005).
- 15 Peros JP, Nguyen TH, Troulet C, Michel-Romiti C and Nottoghem JL, Assessment of powdery mildew resistance of grape and *Erysiphe necator* pathogenicity using a laboratory assay. *Vitis* **45**:29–36 (2006).
- 16 Bouscaut J and Corio-Costet MF, Biodiversity of the powdery mildew: role of retrotransposon discriminating by PCR genetic groups of *Uncinula necator*, in *Oenologie 2003*, ed. by Lonvaud A, De Revel G and Darriet P. Lavoisier, Paris, France, pp. 40–43 (2003).
- 17 Stummer BE, Zanker T, Scott ES and Whisson DL, Genetic diversity in populations of *Uncinula necator*: comparison of RFLP- and PCR-based approaches. *Mycol Res* **104**:44–52 (2000).
- 18 Debieu D, Corio-Costet MF, Steva H, Malosse C and Leroux P, Sterol composition of the wine powdery mildew fungus *Uncinula necator* sensitive or resistant strains to the sterol biosynthesis inhibitor triadimenol. *Phytochemistry* **39**:293–300 (1995).
- 19 Erickson EO and Wilcox WF, Distribution of sensitivities to three sterol demethylation inhibitor fungicides among populations of *Uncinula necator* sensitive and resistant to triadimefon. *Phytopathology* **87**:784–791 (1997).
- 20 Halleen F, Holz G and Pringle KL, Resistance in *Uncinula necator* to triazole fungicides in South African grapevines. *South Afric J Enol Vitic* **21**:71–80 (2000).
- 21 Wong FP and Wilcox WF, Sensitivity to azoxystrobin among isolates of *Uncinula necator*: baseline distribution and relationship to myclobutanil sensitivity. *Plant Dis* **86**:394–404 (2002).
- 22 Delye C, Laigret F and Corio-Costet MF, New tools for studying epidemiology and resistance of grape powdery mildew to DMI fungicides. *Pestic Sci* **51**:309–314 (1997).
- 23 Delye C, Laigret F and Corio-Costet MF, A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl Environ Microbiol* **63**:2966–2970 (1997).
- 24 Delye C, Laigret F and Corio-Costet MF, Cloning and sequence analysis of the eburicol 14 α -demethylase gene of the obligate biotrophic grape powdery mildew fungus. *Gene* **195**:29–33 (1997).
- 25 Delye C, Bousset L and Corio-Costet MF, PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 alpha-demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, a 'recalcitrant' fungus. *Curr Genetics* **34**:399–403 (1998).
- 26 Wyand RA and Brown JKM, Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with the resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. *Fungal Genet Biol* **42**:746–735 (2005).
- 27 Baudoin A, Olaya AG, Delmonte F, Colcol F and Sierotski H, Qol resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the Mid-Atlantic United States. *Plant Manag Network, Plant Health Prog* DOI: 10.1094/PHP-2008, p.02111-02 (2008).
- 28 Kianianmomeni A, Schwarz G, Felsenstein FG and Wenzel G, Validation of a real-time PCR for the quantitative estimation of a G143A mutation in the cytochrome bc(1) gene of *Pyrenophora teres*. *Pest Manag Sci* **63**:219–224 (2007).
- 29 Bäumler S, Sierotski H, Gisi U, Mohler V, Felsenstein FG and Schwarz G, Evaluation of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates for resistance to strobilurin fungicides with different SNP detection systems. *Pest Manag Sci* **59**:310–314 (2003).
- 30 Luo Y, Ma Z and Michailides TJ, Quantification of allele E198A in beta-tubulin conferring benzimidazole resistance in *Monilia fructicola* using real-time PCR. *Pest Manag Sci* **63**:1178–1184 (2007).
- 31 Schwarz G, Baumler S, Block A, Felsenstein FG and Wenzel G, Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR – art. no. e24. *Nucleic Acids Res* **32**:E24–E24 (2004).
- 32 Yan L, Yang Q, Zhou Y, Duan X and Ma Z, A real-PCR assay for quantification of the Y136F allele in the CYP51 gene associated with *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* resistance to sterol demethylase inhibitors. *Crop Prot* **28**:376–280 (2009).
- 33 Chen C, Zhao W, Lu Y, Wang J, Chen Y, Li H, et al, High-throughput detection of highly benzimidazole-resistant allele E189A with mismatch primers in allele-specific real-time polymerase chain reaction. *Pest Manag Sci* **65**:413–419 (2008).
- 34 Zhang T and Fang HHP, Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**:281–289 (2006).
- 35 Fraaije BA, Butter JA, Coehlo JM, Jones DR and Hollomon DW, 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 Pathol* **51**:45–54 (2002).
- 36 Valsesia G, Gobbin D, Patocchi A, Vecchione A, Pertot I and Gessler C, Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in grapevine leaves by means of quantitative Real-Time Polymerase chain reaction. *Phytopathology* **95**:672–678 (2005).
- 37 Sirven C, Gonzalez E, Buffler E, Latorse MP and Beffa R, PCR-based method for detecting mutation allele frequencies for Qol resistance in *Plasmopara viticola*, *Proc BCPC Conference: Pests and Diseases*, British Crop Protection Council, Alton, Hants, UK, pp. 823–828 (2002).
- 38 Toffolatti SL, Serrati L, Sierotzki H, Gisi U and Vercesi A, Assessment of Qol resistance in *Plasmopara viticola* oospores. *Pest Manag Sci* **63**:194–201 (2007).
- 39 Delye C, Ronchi V, Laigret F and Corio-Costet MF, Nested allele-specific PCR primers distinguish genetic groups of *Uncinula necator*. *Appl Environ Microbiol* **65**:3950–3954 (1999).
- 40 Bouscaut J and Corio-Costet MF, Detection of a specific transposon in *Erysiphe necator* from grapevines in France. *J Phytopathol* **155**:381–383 (2007).
- 41 Hajjeh H, Miazzi M, De Guido MA and Faretra F, Specific SCAR primers for the 'flag shoot' and 'ascospore' biotypes of the grape powdery mildew fungus *Erysiphe necator*. *J Plant Pathol* **87**:71–74 (2005).
- 42 Nunez Y, Gallego J, Ponz F and Raposo R, Analysis of population structure of *Erysiphe necator* using AFLP markers. *Plant Pathol* **55**:650–656 (2006).
- 43 Delye C, Corio-Costet MF and Laigret F, A RAPD assay for strain typing of the biotrophic grape powdery mildew fungus *Uncinula necator* using DNA extracted from the mycelium. *Exp Mycol* **19**:234–237 (1995).
- 44 Martinez F, Dubos B and Fermaud M, The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* **95**:692–700 (2005).
- 45 Leroux P, Albertini C, Gauthier A, Gredt M and Walker AS, Mutations in the cyp51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 alpha-demethylase inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* **63**:688–698 (2007).
- 46 Hamamoto H, Hasegawa K, Nakaune R, Makizumi YJ, Akutsu K and Hibi T, Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 alpha-demethylase (CYP51A1) in *Penicillium digitatum*. *Appl Environ Microbiol* **66**:3421–3426 (2000).
- 47 Luo CX, Cox KD, Amir A and Schnabel G, Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element 'Mona' in *Monilia fructicola*. *Plant Dis* **92**:1099–1103 (2008).
- 48 Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M and Kelly S, Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* **8**:76–81 (2002).

- 49 Ma ZH, Proffer TJ, Jacobs JL and Sundin GW, Overexpression of the 14 alpha-demethylase target gene (CYP51) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Appl Envir Microbiol* **72**:2581–2585 (2006).
- 50 Schnabel G and Jones AL, The 14 alpha-demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* **91**:102–110 (2001).
- 51 DeWaard MA, Andrade AC, Hayashi K, Schoonbeck HJ, Stergiopoulos I and Zwiers LH, Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Manag Sci* **62**:195–207 (2006).
- 52 Hayashi K, Schoonbeck H and De Waard MA, Expression of the ABC transporter BcatrD from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitor fungicides. *Pestic Biochem Physiol* **73**:110–121 (2002).
- 53 Stergiopoulos I, Van Nistelrooy JGM, Kema GHJ and De Waard MA, Multiple mechanisms account for variation in baseline sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* **59**:1333–1343 (2003).
- 54 Sombardier A, Dufour MC, Blancard D and Corio-Costet MF, Sensitivity of *Podosphaera aphanis* isolates to DMI fungicides: distribution and reduced cross-sensitivity. *Pest Manag Sci* **66**:35–43 (2010).
- 55 Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer J and Parr-Dobrzanski B, The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci* **58**:649–662 (2002).

ANNEXE 19

Corio-Costet, M.-F.; Dufour, M.-C.; Cigna, J.; Abadie, P.; Chen, W.-J.
Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI
fungicides. *European Journal of Plant Pathology* (2011), 129: 315-329

Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides

Marie-France Corio-Costet ·
Marie-Cécile Dufour · Jérémy Cigna ·
Pierre Abadie · Wei-Jen Chen

Accepted: 20 October 2010 / Published online: 17 November 2010
© KNPV 2010

Abstract The effectiveness of Quinone outside Inhibitor (QoI) fungicides against grape downy mildew in European vineyards has significantly decreased in the last decade. One nucleotide polymorphism, G143A in the cytochrome *b* gene of *Plasmopara viticola*, is involved in resistance to QoIs. Previous genetic examination on the mitochondrial genomes showed four major haplotypes (IR, IS, IIR, IIS) coexisting in European vineyards. A resistant allele (G143A) was present in IR and IIR haplotypes. The purpose of the present study was to estimate the diversity of the different mitochondrial haplotypes and their distribution in QoI-resistant populations before evaluating the potential cost of the resistant mutation G143A in *P.*

viticola population. From 2000 to 2004, the frequencies of resistant isolates ranged from 0% to 23.25% with an average of 4.64 % among the populations examined. To evaluate the fitness of sensitive and resistant isolates, a comparison of different biological parameters including latent period, spore production and infection frequency was performed, enabling a fitness index (F_1) to be determined. Resistant isolates exhibited greater infection frequency than sensitive isolates, whereas no significant difference was found in sporulation ability and latent period between sensitive and resistant isolates. To further investigate competitiveness among isolates, an assay including two resistant isolates in different proportion with a sensitive isolate was conducted on eight asexual growing cycles in the absence of a QoI fungicide. The competitiveness of resistant isolates varied according to their fitness parameters, suggesting that there is no noticeable cost of QoI resistance in controlled conditions in *Plasmopara viticola*.

M.-F. Corio-Costet (✉) · M.-C. Dufour · J. Cigna
UMR Santé Végétale, 1065, ISVV, IFR 103, INRA,
Rue Edouard Bourleaud, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon,
France
e-mail: coriocos@bordeaux.inra.fr

Present Address:
P. Abadie
UMR 1202 BIOGeCo,
Laboratoire de génétique des arbres forestiers, INRA,
69 route d'Arcachon,
33612 Cestas, France

Present Address:
W.-J. Chen
Institute of Oceanography, National Taiwan University,
No.1 Sec. 4 Roosevelt Rd.,
Taipei 10617, Taiwan

Keywords Cytochrome *b* · Fitness · Fungicide resistance · Grapevine downy mildew · Mitochondrial variability · qPCR

Abbreviations

CAPS Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
 F_1 fitness index
QoI Quinone outside Inhibitor
ARMS Amplification refractory mutation system
SNPs Single Nucleotide Polymorphisms

Introduction

Downy mildew caused by the oomycete *Plasmopara viticola* is a major grape disease worldwide. The pathogen is a native species from North America that was reported in Europe in 1878 in Coutras in (Bordeaux region) by Planchon (Galet 1977). Grapevine downy mildew (*P. viticola*) attacks all important cultivars for vine and table grape production. Depending on epidemic pressure and cultural practices, production losses of up 100% can occur. For effective control of the disease, various fungicides, including Quinone outside Inhibitor fungicides (QoIs), have been widely used. However, strong selection pressure following repeated QoI applications can result in the development of QoI-resistant populations which has limited the success of these fungicides in grapes and other crops (Gisi et al. 2002; Grasso et al. 2006). Thus, only a few years after the introduction of QoI fungicides in 1996, *P. viticola*-resistant populations were detected not only in French vineyards, (Magnien et al. 2003) but also in the vineyards of other European countries and the United States (Baudoin et al. 2008; Corio-Costet et al. 2008; Collina et al. 2005; Heaney et al. 2000; Sierotzki et al. 2005).

The QoI fungicides inhibit the cytochrome bc₁ enzyme complex of the respiration chain in mitochondria (Jordan et al. 1999; Bartlett et al. 2002). Due to their site-specificity, QoI fungicides have been reported as being at high risk for encouraging the development of resistance in several target pathogens (Grasso et al. 2006). In most pathogens, two major mutations in the cytochrome *b* gene have been described (G143A, F129L) as being involved in resistance mechanisms. The mutation resulting in the replacement of glycine by alanine at amino acid codon position 143 (G143A) has been widely recognized (Gisi et al. 2002; Grasso et al. 2006).

To understand the mechanism leading to the evolution of fungicide resistance in a plant-pathogen system, Chen et al. (2007) conducted a phylogenetic analysis of a large mitochondrial DNA fragment including the cytochrome *b* gene (2.281 bp) across a wide range of *P. viticola* isolates. Four major haplotypes were detected belonging to two genetically distinct groups (I and II), in which the resistance allele carrying the G143A mutation can be present. This indicated at least two origins of fungicide resistance in the grapevine downy mildew population. In France,

haplotype group I (IR and IS) and group II (IIR and IIS) reached a frequency of 75% and 25% respectively among populations tested, but their distribution may vary (Chen et al. 2007; Corio-Costet et al. 2008). For instance, in the Champagne (France) an average of 10% of haplotype group II was detected and the significance of the two mitochondrial haplotypes is unclear (Corio-Costet et al. 2006). As regards the resistant allele proportion IR and IIR within a population, the resistant haplotype IR ranged from 67.7% to 98.3% of resistant alleles depending on the location (Chen et al. 2007; Corio-Costet et al. 2006). The first objective of this work was to estimate the distribution of every haplotype in European *P. viticola* populations.

Although a biological test (Wong and Wilcox 2000; Genet et al. 1997) or molecular tools have been used to quantify the resistance alleles using real-time q-PCR, ARMS PCR or PCR, (Collina et al. 2005; Grasso et al. 2006; Toffolatti et al. 2007; Sirven and Beffa 2003) or to detect resistant haplotypes using the CAPS method, (Corio-Costet et al. 2006; Baudoin et al. 2008; Furuya et al. 2009) little is known about the fitness of QoI-resistant isolates. One study suggested that an artificial *P. viticola* population containing 5% of resistant isolates tended to increase QoI sensitivity (Genet et al. 2006). The second objective of our study was to try to understand how fungicide resistance develops by measuring the fitness of *P. viticola* isolates, without fungicide pressure. The fitness, or the selective value, of pathogens (Antonovics and Alexander 1989; Pringle and Taylor 2002) can be defined as the survival and reproductive success of an allele, individual or group, or as an organism's ability to contribute to the subsequent gene pool (Vanderplank 1982), which is measured as a function of its ability to grow, reproduce and survive through repeated life cycles. It is estimated either by measuring components of fitness such as reproductive ability and pathogenicity, or by assessing the actual population after competing with each other on a susceptible host. Usually, the general ability of pathogens to accommodate resistance mutations without a harmful loss of fitness is largely unknown, but in early studies the appearance of fungicide resistance was not generally accompanied by an immediate fitness cost in the absence of fungicides (Anderson 2005). The rapidity of the appearance of QoI resistance and the behaviour of resistant isolates in populations could suggest a good fitness value of resistant isolates that is assessed here.

The final objective of the study was to determine whether QoI resistance in *P. viticola* was associated with a resistance cost. For this, we performed fitness and competitiveness studies to investigate the potential of dispersal and the preservation of *P. viticola* isolates resistant to QoI fungicides. In particular, we assessed the following: i) the diversity of QoI haplotype in European countries; ii) the fitness of sensitive and resistant isolates of *P. viticola*, by comparing latent period, sporulation, infection frequency and competitiveness; and iii) the cost of QoI resistance in grapevine downy mildew.

Materials and methods

Plant material

All tests were performed with grapevine leaves of Cabernet Sauvignon cultivar. Grapevine plants (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) were propagated from wood cuttings in a greenhouse. All tests were performed with grapevine leaves of 2-month-old plants (ten to 12 leaves) for experimentation on foliar discs.

P. viticola sampling and collection

A total of 1,366 downy mildew lesions on *Vitis vinifera* were collected between 2003 and 2004 or were donated by a Swiss colleague (D. Gobbin) for 2000 and 2001. Each sample from 2003 and 2004 came from a sparse plot on leaves collected between June and July during the growing season (Table 1).

For isolate collection, a total of 11 QoI-sensitive isolates and 12 QoI-resistant isolates were collected in 2003 at the beginning of the growing season on grapevine leaves in the Bordeaux vineyard in France (11 + 11) and one in the Freiburg vineyard in Germany (1) (Table 2). All monosporangial isolates were preserved on grapevine leaves at -20°C .

Fungicide sensitivity tests

To characterize the sensitivity of *P. viticola* isolates to QoI fungicides, single lesions were multiplied onto leaves of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Sporangia were collected and suspended in sterile

water at 4°C . Inoculation was performed by depositing fifteen $10\ \mu\text{l}$ droplets onto the abaxial face of each leaf. One day later the water droplets were removed by aspiration with a water pump. The leaves were incubated in Petri dishes under controlled conditions (22°C) with a 16 h light day ($35\ \mu\text{m m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) for 7 days. Freshly produced sporangia were harvested to inoculate the test units. Assays were described in Chen et al. (2007). Briefly, Cabernet Sauvignon leaf discs with abaxial surface exposed were prepared as described above. Excised discs were randomized and placed lower surface exposed on moist filter paper into Petri dishes, with eight repetitions for each concentration. Experiments were also duplicated independently. The QoI tested was famoxadone (IUPAC name: 3-anilino-5-methyl-5-(4-phenoxyphenyl)-1, 3-oxazolidine-2,4-dione) (WG 50%, Dupont de Nemours). Famoxadone was applied by spraying in water solution at desired concentrations. The solutions were applied using a hand sprayer in order to spray $10\ \mu\text{l}$ per cm^2 . The fungicide test was repeated at least twice with a range of eight or ten concentrations adapted to the response of each isolate in order to obtain a dose-response curve. After using a discriminatory dose of $10\ \text{mg l}^{-1}$, according to the sensitivity of each isolate, ranges of concentrations for resistant isolates (0, 50, 100, 200, 500, 800, 1,000, mg l^{-1}) or for sensitive isolates (0, 0.02, 0.05, 0.08, 0.1, 0.15, 0.2, 0.5, 1, 2 mg l^{-1}) were prepared to determine the EC_{50} of isolates. After drying surfaces, the leaf discs were inoculated with three droplets of $10\ \mu\text{l}$ per disc of inoculum at 20,000 sporangia per ml. Petri dishes were incubated for 7 days under the conditions described above. Seven days after inoculation, development of mildew on leaf discs was determined by assessing the proportion of sporulation per unit of leaf area (Genet et al. 1997). The average score for each fungicide concentration was converted to a percentage of inhibition by comparison with the untreated disks. The fungicide concentration inhibiting 50% of growth (EC_{50}) discriminated two classes of isolates according to their sensitivity to famoxadone: famoxadone-sensitive isolates (EC_{50} and MIC $<10\ \text{mg l}^{-1}$) and highly resistant isolates (EC_{50} and MIC $>1,000\ \text{mg l}^{-1}$). Dose response curves for individual isolates were generated by plotting the relative growth values against \log_{10} of the fungicide concentration used. The \log_{10} effective dose to reduce growth by 50% (EC_{50}) was calculated from the

Table 1 Average of mitochondrial haplotype distribution in European populations of *Plasmopara viticola* collected between 2000 and 2004

Country	Location	N	Year	% of European mitochondrial haplotypes			
				IS	IR	IIS	IIR
France	Bordeaux	506	2003	50.20	23.90	22.70	3.20
	Champagne	122	2003	73.78	22.13	4.10	0.00
	Dordogne	84	2003	47.62	21.43	31.00	0.00
	Loire	121	2003	69.42	8.26	22.30	0.00
	Vallée du Rhône	86	2003	80.23	5.81	14.00	0.00
	Bourgogne	33	2004	36.37	30.30	12.10	21.20
	Jurançon-Gers	63	2004	38.10	34.90	27.00	0.00
Mean		1015		56.53	20.96	19.03	3.49
Germany	Rheingau	16	2000	68.75	0.00	31.25	0.00
	Rheingau	27	2003	70.37	0.00	29.67	0.00
	Baden	50	2003	76.00	16.00	8.00	0.00
Mean		93		71.71	5.33	22.97	0.00
Greece	Thessalie	21	2001	90.47	0.00	9.53	0.00
Italy	Piemont	8	2000	75.00	0.00	25.00	0.00
	Chianti	18	2000	77.78	0.00	22.22	0.00
	Haut Adige	15	2000	100.00	0.00	0.00	0.00
Mean		41		84.26	0.00	15.74	0.00
Portugal	Refois do lima	18	2004	89.00	0.00	11.00	0.00
	Corricha	25	2004	88.00	0.00	12.00	0.00
	Gaifar	25	2004	64.00	8.00	28.00	0.00
Mean		68		80.33	2.67	17.00	0.00
Romania	Timisoara	67	2004	97.02	0.00	2.98	0.00
Switzerland	Tessin	21	2000	90.48	0.00	9.52	0.00
	Vaud	22	2000	63.64	0.00	36.36	0.00
	East County	18	2000	88.89	0.00	11.11	0.00
Mean		61		81.00	0.00	19.00	0.00
Europe (Mean±Sem)		1366	2000–2004	80.19±4.98	4.14±2.91	15.18±2.56	0.5±0.5

regression equation generated through the linear proportion of the sigmoid curve.

Measurements of aggressiveness components

The following fitness components were measured comparatively in sensitive and resistant isolates: latent period, the number of spores obtained per deposited spore after 7 days of growth, and the infection frequency, using methods similar to those described by Tooley et al. 1986 and Kadish and Cohen 1988. All the measurements were performed on three plates, each containing five discs of

grapevine leaves inoculated as described above with three droplets of 15 µl of sporangial suspension at 2,500 spores per ml.

The latent period (LP) was estimated by observing sporangia appearance daily, as the mean period (hours) to obtain 50% of the total sporulation. Three plates containing five discs of leaf abaxial face on the top were inoculated with three droplets of 15 µl at 2,500 sporangia per ml, leading to 45 points per isolate per experiment. The experiments were repeated at least twice independently. The onset of sporulation was measured daily on a notation scale as described in Chen et al. 2007.

Table 2 Origin and characteristics of monosporangial isolates used in fitness studies

Isolate	Locality of vineyard	Year	Mitochondrial haplotype (I or II)	QoI sensitivity	QoI CI ₅₀ (mg/ml±SEM)
AVI 02	Champagne	2003	II	S	0.90±0.01
COU 15	Bordeaux	2003	I	S	0.07±0.01
FEM 03	Bourgogne	2003	II	S	0.10±0.03
MOR 22	Bordeaux	2003	II	S	0.05±0.01
PIC 21	Bordeaux	2003	II	S	0.10±0.02
BOM 06	Bordeaux	2003	II	S	0.07±0.02
EPE 09	Champagne	2003	I	S	0.22±0.01
CAZ 22	Bordeaux	2003	II	S	0.13±0.01
MIC 103	Bourgogne	2003	II	S	0.04±0.01
MIC 123	Rhône Valley	2003	I	S	0.09±0.01
ALS 07	Alsace	2003	I	S	0.28±0.01
CGU 20	Bordeaux	2003	I	R	>1,000
COU 23	Bordeaux	2003	II	R	>1,000
EAU 13	Midi-pyrénées	2003	I	R	>1,000
FRE 01 ¹	Freiburg	2003	I	R	>1,000
MIC 125	Midi-pyrénées	2003	I	R	>1,000
MIC 126	Midi-pyrénées	2003	I	R	>1,000
MIC 128	Midi-pyrénées	2003	I	R	>1,000
MOR 08	Bordeaux	2003	I	R	>1,000
PAR 29	Bordeaux	2003	I	R	>1,000
PIC 59	Bordeaux	2003	I	R	>1,000
PAU 32	Bordeaux	2003	II	R	>1,000
SAL 19	Bordeaux	2003	II	R	>1,000

Spore production (N_t / N_{t0}) was assessed by washing five inoculated discs of each plate (3) in a vial containing 16 ml of Isoton II (saline buffer) supplemented with a drop of dispersant type IIIA, and the number of sporangia produced per plate containing five discs inoculated by three drops was determined (N_t) with a Multisizer 3 Coulter counter (Beckman Coulter, France, Villepinte). Experiments were repeated at least twice independently, giving six measures each corresponding to the sporulation obtained for 562 deposited sporangia (N_{t0}).

Infection frequency (IF) was defined as the proportion of inoculated leaf disks on which lesions developed. Observations were quantified as the number of inoculation points with a suspension of 2,500 spores per mL giving sporulating lesions 7 days after inoculation. Three plates containing five leaf discs were inoculated by three drops of 15 μ l per disc. Experiments were repeated twice independently.

From these different parameters, a composite fitness index (F_1) was calculated for each isolate using the formula $AI = \ln(N_t/N_{t0}) \times IF \times 1/LP$ derived from Montarry et al. 2008.

Competitiveness test

The relative competitiveness of two pairs of resistant/sensitive isolates MIC128-COU15 (R1-S1) and PAU32-COU15 (R2-S1) was compared at three initial ratios of spore concentrations, 20:80, 50:50, and 80:20. Spore suspensions of each isolate were prepared as described previously. Mixed inocula were generated by thoroughly mixing appropriate volumes of sporangia to obtain the desired R:S ratios on the basis of 40,000 spores per ml total in the different mixtures. Inoculation was carried out with a mixed spore suspension in the same way as described for infection tests. Four plates containing five discs were inoculated for each ratio and every 7 days, four new

plates with five discs were inoculated again with the spores obtained at 40,000 spores per ml. Then, a biological test with famoxadone at 100 mg l⁻¹ was performed as described above in fungicide sensitivity test section and a reference curve was established to evaluate the ratio of resistant isolates in the spore mixtures obtained after each asexual cycle. To confirm those ratios, a quantitative PCR assay was also performed to quantify the presence of resistant alleles from spore suspensions used to inoculate the new leaf discs at each cycle. Two independent experiments were performed for 8 weeks.

Statistical analysis

Data from two experiments were pooled together according to homogeneity of variance using the ANOVA procedure in Systat software (Systat 11. software, 2004, USA) to determine homogeneity of variance among repeated experiments. The values or groups were compared using the Tukey *t* test with $P < 0.05$ for q-PCR assay or were compared using Fisher's LSD test with $P < 0.05$ for the bioassay. All data for each fitness component were subjected to an analysis of variance (ANOVA). To analyze frequency haplotype distribution, a chi2 test was performed.

DNA extraction

P. viticola lesions were frozen. After freeze-drying overnight, DNA was extracted from each oil spot or spore suspension (containing infected grapevine leaf tissue and sporangia) according to the standard CTAB-phenol/chloroform method described by (Zolan et Pukkila 1986) with a slight modification (phenol-chloroform was replaced with isoamyl alcohol/chloroform). After extraction, DNA was precipitated with isopropanol, the pellet was washed with

70% ethanol and resuspended in 50 µl of sterile water.

Allele-specific restriction

The molecular method used to differentiate sensitive or resistant isolates was the amplification of the allele specific to the Cytochrome *b* gene of *P. viticola* (accession numbers DQ459464, DQ459466, DQ459467, DQ459469) exhibiting single nucleotide polymorphisms between sensitive and resistant isolates or between haplotype I or II (Chen et al. 2007). A CAPS analysis of cytochrome *b* gene fragments was performed using the primers COB 279F and COB 865R (Table 3) under amplification conditions according to the method described by Baudoin et al. (2008) and Corio-Costet et al. (2006). Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a 15 µl volume containing 1 µl of DNA diluted three-fold, 1.5 µl of 10x PCR buffer (Eurogentec), 1.5 mM MgCl₂, 0.13 µM of each dNTP, 0.13 µM of each primer (COB 279 F and CB 865R), 0.2 U (3.33 nkat) *Taq* silverstar DNA (Eurogentec). The PCR program was a first denaturation step of 4 min at 96°C, followed by 36 cycles of 45 s at 96°C, 50 s at 50°C, 1 min at 72°C. This DNA fragment was cut with the restriction enzymes *Sat1* and *Hinf1*, with the recognition sequence 5'-GCNGC-3' and 5'-GANTC-3'. Cleaving reactions were performed in 10 µl volume with 1.2 µl of PCR product, 1 µl of 10X- buffer Tango (MBI fermentas), 1 U (16.67 nkat) of *Sat1* and 1U (16.67 nkat) of *Hinf1* enzymes (MBI Fermentas) at a temperature of 37°C and an incubation period of 2 h. Restriction fragments were visualized on 2% agarose after staining with ethidium bromide. *Sat1* enzyme was used to detect the resistant mutation and to cut the amplified fragment of 605 bp, generating two fragments of 147 and 458

Table 3 Sequence of primers and hybridization probes used in the real-time polymerase chain reaction assay on *Plasmopara viticola* isolates

Primer	Sequence (5'to 3')	Nucleotide position	Sense
COB 279F	TAT ACA TAT TTT TAG GGG TTT G	1100	Forward
COB 865R	ACA TAG CGA TAA CAC CAC CAA	1704	Reverse
qPV-L	TTA GGG GTT TGT ATT ACG GAT CTT	1111	Forward
qPV-R	TCC CCA AGG CAA AAC ATC CC	1229	Reverse
qPV143R-L	GGA CAA ATG AGT TTT TGG GC	1227	Forward
qPV143RS-R	ATT ATC AAC GGC GAA TCC AC	1337	Reverse

pb each. *HinfI* enzyme was used to determine haplotypes and to cut the fragment, generating two fragments of 222 and 383 pb.

QoI real-time q-PCR

Genotyping of QoI-resistant mutations was performed with a real-time thermal iCycler iQ (BioRad, Hercules, CA, USA) using specific sets of primers and hybridization probes (Table 3). Primer sets qPV-L/qPV-R and qPV143R-L/qPV143RS-R (Table 3) were used to amplify preferentially one allele by matching the desired allele and mismatching the other allele at the 3' end of the primers according to Sirven and Beffa (2003). Reverse primers were designed to have mismatches at the 3' as described by Sirven and Beffa (2003). For each reaction, 1 μ l of each primer at 10 nM and 7 μ l of 2x-Mix blue SYBR green fluorescein Mix including Hot start DNA polymerase, DNTP and MgCl₂ (Abgene, France) and 5 μ l of DNA diluted three times were used in compliance with the manufacturer's instructions. Assays (14 μ l) were performed in ABgene PCR thermo-fast[®] 96, semi-skirted plates (Thermoscientific, France). Amplification and detection were performed in a real-time thermal iCycler iQ under the following conditions: one cycle at 94°C for 15 min, and 40 cycles at 94°C for 10 s, 60°C (primer set qPV-L/qPV-R) and 60°C (qPV143R-L/qPV143RS-R) for 10 s, and 72°C for 20 s. Increase in fluorescent emission signal from SYBR Green I (ΔRn) was recorded at 72°C without normalization of the signal. The iCycler[™] Q software version 3.0_a (BioRad) was used to analyze the data. For each sample, the amount of target DNA was quantified using appropriate calibration curves in which *Ct* was plotted against the amount of target DNA.

Results

Mitochondrial haplotype distribution in European vineyards

The survey of the geographical distribution of mitochondrial haplotypes from a panel of 1,366 *P. viticola* isolates collected between 2000 and 2004 in European vineyards was performed with an SNP typing assay. The frequency of the four main

European haplotypes was estimated in four French, three German, one Greek, three Italian, one Romanian, three Portuguese and three Swiss populations (Table 1). Haplotype group I (IS and IR) predominated in all countries in a range from 77.44% to 97.02%, with an average of 84.33%. Haplotype group II (IIS and IIR) represented 2.98% to 22.56% depending on the country, with an average of 15.68%. With regard to QoI resistance, haplotype IR predominated, with levels depending on the country and locality in a range from 0% to 20.99% and an average of 4.14%. The resistant haplotype IIR was the most uncommon and was found only in two French vineyards in Bordeaux and Bourgogne. More resistant haplotypes were detected in 2003–2004 than in 2000–2001, with an average of 16.26% and 0% respectively.

QoI sensitivity and haplotype characteristics

Throughout the study, 11 sensitive isolates and 12 resistant isolates collected in 2003 were tested independently at least twice to evaluate their famoxadone sensitivity. EC₅₀ values for resistant isolates were higher than 1,000 mg l⁻¹ of famoxadone (Table 2). Sensitive isolates exhibited EC₅₀ values ranging from 0.1 to 0.9 mg l⁻¹, with a mean of 0.19 mg l⁻¹. Seven sensitive isolates belonged to haplotype II and four belonged to haplotype I (COU15, COL07, MIC123 and EPE 09). By contrast, the resistant haplotype II was uncommon, while only three isolates (SAL19, PAU 32, COU 23) from the laboratory collection belonged to this haplotype. The level of QoI resistance between sensitive and resistant isolates expressed as the relative resistance factor varied in a range from 1111 to 25,000, with an average of 5263.

Latent period, sporangium production and infection frequency

Data on the fitness of 23 isolates inoculated separately onto grapevine leaf discs are given in Table 4. Three parameters (latent period, sporulation capacity and infection frequency) were recorded. A wide variation in fitness parameters was found in sensitive and resistant isolates. However, no difference was found for latent period between sensitive and resistant isolates ($P=0.523$) (Table 4, Fig. 1). Sensitive isolates had a mean of 102.7 \pm 1.57 h and resistant isolates

Table 4 Fitness components of sensitive and QoI-resistant isolates on grapevine leaf disks at 22°C (means±SEM)

Isolate	QoI sensitivity	Latent period (h±SEM)	Sporulation (Nt/Nt ₀) (± SEM)	Infection frequency (± SEM)	AI (Ln (Nt/Nt ₀) IF /LP)
ALS 07	S	140±2.93	537±70	0.94±0.01	1.28 ^a
AVI 02	S	86.5±1.47	1022±310	0.94±0.03	2.41
BOM 06	S	96±3.56	332±73	0.86±0.03	1.09
CAZ 22	S	97±2.35	783±119	0.91±0.02	1.99
COU15	S	88±0.59	534±76	0.98±0.02	1.78
EPE 09	S	107.5±2.64	351±79	0.72±0.06	0.86
FEM 03	S	97±0	821±166	0.97±0.03	2.11
MIC 103	S	107±1.7	783±119	0.79±0.01	1.77
MIC 123	S	97.5±1.47	1267±238	0.97±0.01	2.53
MOR22	S	103±0.59	896±227	0.76±0.02	1.99
PIC 21	S	110±0.59	421±49	0.42±0.13	0.48
Mean		102.7±1.57	704±139	0.84±0.035	1.75±0.65
CGU 20	R	89.5±0.29	565±120	1.00±0.00	1.84
COU 23	R	108.5±0.29	555±139	0.96±0.04	1.59
EAU 13	R	91.5±2.05	1015±264	1.00±0.00	2.41
FRE 01	R	104.5±0.29	550±125	1.00±0.00	1.66
MIC 125	R	93.25±1.61	996±156	0.99±0.01	2.36
MIC 126	R	103±0.59	802±208	0.93±0.07	1.98
MIC 128	R	92.5±1.47	844±90	0.94±0.06	2.15
MOR 08	R	93.25±0.44	901±139	0.94±0.03	2.21
PAU32	R	139±5.28	693±133	0.96±0.04	1.57
PAR 29	R	95±0.59	1048±115	0.91±0.09	2.31
PIC 59	R	96±1.76	1508±407	1.00±0.00	2.75
SAL 19	R	105±1.17	484±160	0.68±0.14	1.14
Mean		100.9±1.32	830±171	0.94±0.02	2.05±0.45

^a The variation of the fitness index varies from 5% to 18% of the value of F_i according to the isolates considered. For three isolates used for the experiment of competitiveness, we have $F_{iPAU32}=1.57±0.28$ (a), $F_{iCOU15}=1.78±0.22$ (ab), $F_{iMIC128}=2.15±0.15$ (b), with a total variance analysis of $P=0.015$

needed $100.9±1.32$ h to reach their latent period. The range of latent period varied from 86.5 h to 140 h in sensitive isolates and from 89.5 to 139 h in resistant isolates.

Concerning spore production, no significant difference was observed between sensitive and resistant isolates ($P=0.137$). Sensitive isolates produced an average of $704±139$ sporangia and resistant isolates produced $830±171$ sporangia per deposited sporangium (Table 4, Fig. 1). A wide variation was observed within the sensitive isolate group and the QoI-resistant group. Indeed, within a group some isolates produced 3.11- to 3.8-fold more sporangia than others in the resistant (PIC59/SAL19) and sensitive (BOM06/AVI01) groups, respectively. Sporangium size in sensitive and resistant isolates varied widely in a range from 8 to 33 μm in the sensitive and resistant groups, with an average of $18.47 \mu\text{m}±0.03 \mu\text{m}$. We also observed a significant increase in

resistant sporangium size from 3% to 4.6% in the absence or in the presence of famoxadone (data not shown).

As regards infection frequency (IF) in our experimental conditions, a significant difference was obtained ($P=0.02$) between sensitive and resistant groups with $0.84±0.03$ of sensitive isolates and $0.94±0.02$ of resistant isolates succeeding in infecting leaves (Table 4, Fig. 1). The range of infection frequency varied from 0.42 to 0.97 in the sensitive group and from 0.68 to 1 in the resistant group.

From these different parameters, a composite fitness index (F_1) was calculated for each isolate derived from F_i of Tooley et al. (1986) and from the aggressiveness index of Montarry et al. (2008). The mean F_1 in the sensitive group was $1.75±0.65$ and $2.05±0.45$ in the resistant group, but no significant difference was observed ($P=0.147$) (Table 4). The fitness index varied considerably depending on

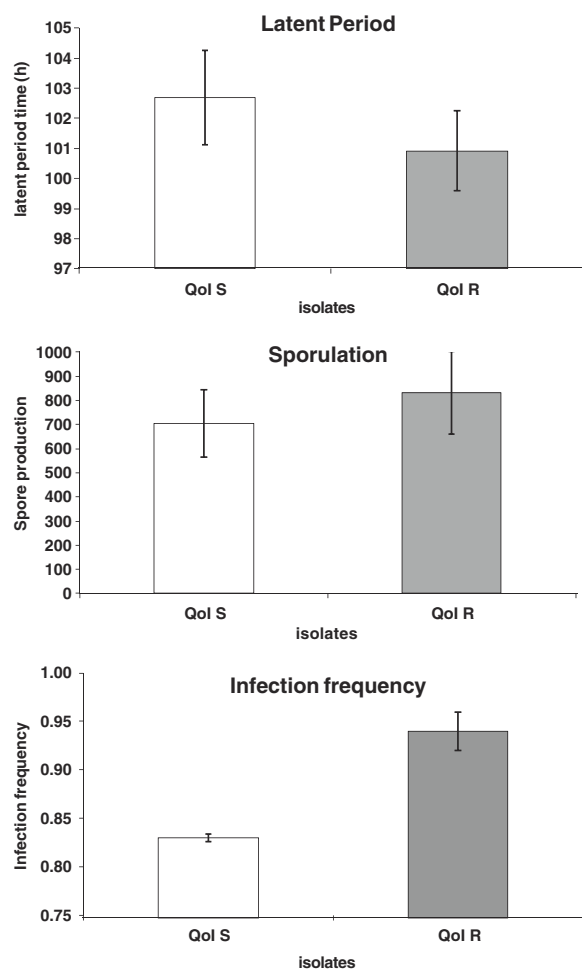


Fig. 1 Fitness component values (Latent period, Sporulation, Infection frequency means±SEM) as a function of sensitive (white) or Qol-resistant isolates (grey)

whether the isolates were sensitive or resistant (Fig. 2). A good correlation was obtained between spore production and the F_I with a regression coefficient R^2 equal to 0.86 ($P < 0.001$). The F_I was then used to choose sensitive and resistant isolates for competitiveness tests having different fitness.

Competitive ability of resistant and sensitive isolates

The objective was to assess the competitive ability of resistant and sensitive isolates in mixed-isolate inoculations on leaf discs and to link these findings to the fitness parameters of isolates. The fitness index of the three isolates was different (Table 4, Fig. 2) with a sensitive isolate COU15 statistically intermediate ($F_I = 1.78, ab$) between both resistant isolates PAU 32 ($F_I = 1.57, a$) and MIC128 ($F_I = 2.15, b$) ($P = 0.015$).

The changes in the frequency of resistant isolates were related to their fitness parameters and their fitness index (Figs. 3 and 4). In one of the pairs used in this study R1-S1, after eight asexual cycles all ratios between sensitive and resistant isolates remained stable at 20%, 50% or 80% of R1 after quantification by q-PCR (Fig. 3). A slightly significant increase ($P < 0.05$) in 20% and 50% of initial ratios was observed at the eighth cycle with the biological quantification method.

In the second pair (S1-R2), a decline in the frequency of R2 was observed after five cycles (Fig. 4) in all three initial ratios, indicating that the resistant isolate R2 was a weak competitor in comparison with its S1 partner. After five cycles, the proportion of resistant isolates decreased 20–25%

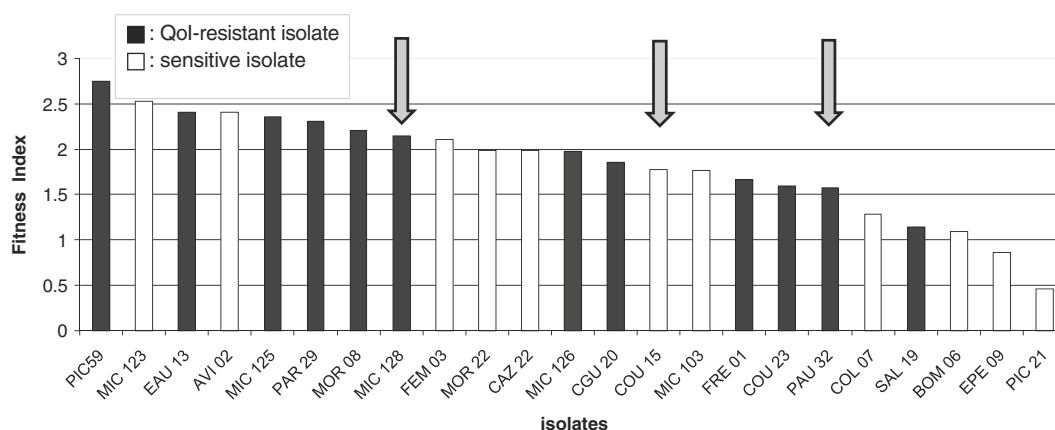
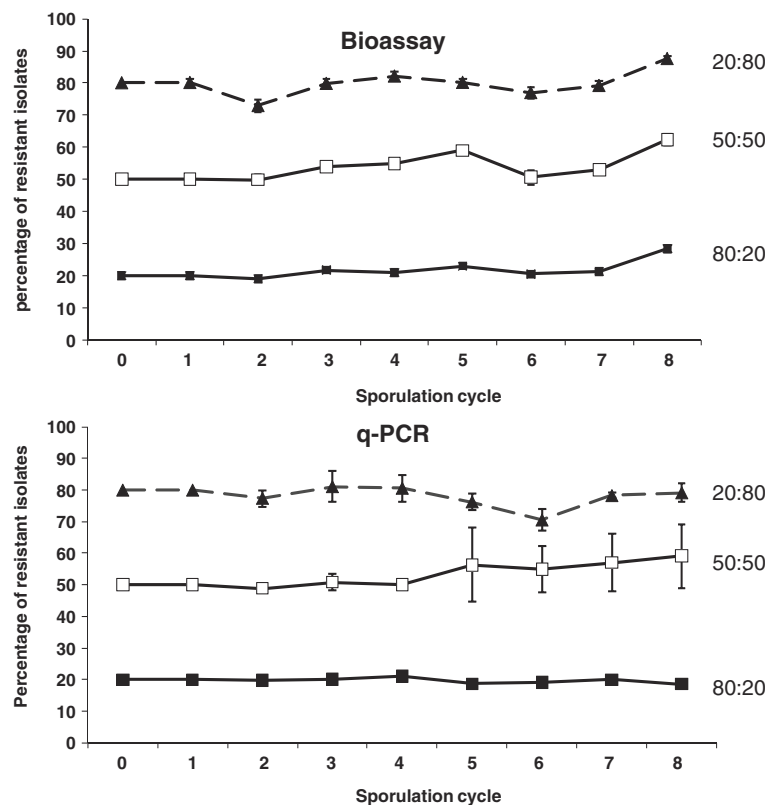


Fig. 2 Fitness index (F_I) of 11 sensitive (white) and 12 Qol-resistant isolates (black). The arrows designate the isolates used in competitiveness experiments

Fig. 3 Dynamic changes (means \pm SEM) in the frequency of QoI-resistant isolate sporangia in sporangial populations harvested from grapevine leaf discs inoculated with three mixtures of QoI-sensitive COU15 and QoI-resistant sporangia MIC128 in various proportions (20:80 (—■—), 50:50 (—□—) and 80:20 (—▲—) during eight asexual generations, assessed by bioassay or q-PCR method. The second sporulation cycle was initiated with sporangia resulting from the initial infection and subsequent sporulation cycles were conducted accordingly. Each point is mean of six replicates



compared to the initial ratio. With the q-PCR test, a significant and stronger decrease in the different ratios with R2 was observed from the third cycle, leading to a dramatic reduction during the eighth cycle, with a decrease of 5% ($P=0$), 49.56% ($P=0.006$) and 97.5% ($P=0.004$) at the ratios 80:20, 50:50 and 20:80, respectively (Fig. 4).

Discussion

Diversity

According to previous results obtained in French vineyards (Chen et al. 2007; Corio-Costet et al. 2006, 2008), haplotype I is the most widespread haplotype in Europe, with a mean of 84.33% (IS-IR). Regarding the analyses of the 1,366 isolates obtained between 2000 and 2004, only 4.54% (IR-IIR) of isolates were QoI-resistant, with haplotype IR representing 91.19% of resistant haplotypes. By contrast, French vineyards were significantly more resistant during this period than other vineyards exhibiting few resistant isolates (0–2.94%) such as Greek, Italian,

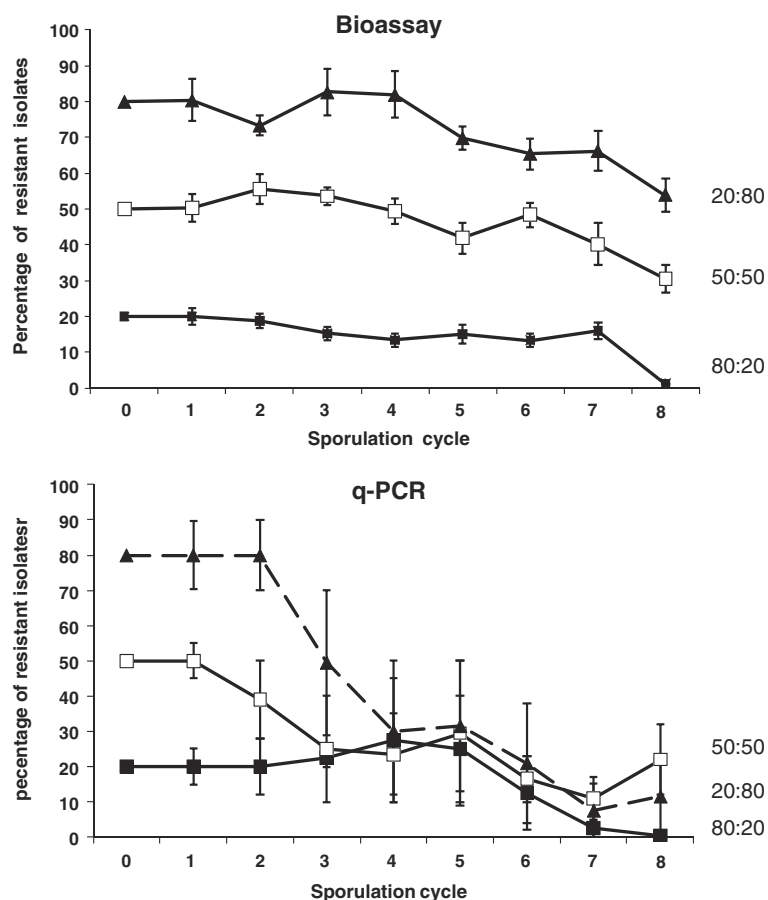
Swiss and Romanian vineyards. Haplotype IIR was rare, except in Bourgogne where it represented 21.2%. The role of the presence of haplotypes I and II in *P. viticola* population remains unclear.

Our results on 1,015 mildewed lesions showed that in French vineyards in 2003 and 2004, at the beginning of the growing season and before any selection by a fungicide, 76.75% of *P. viticola* isolates were still sensitive. However, according to Sierotzki et al. (2005), who showed a sharp decrease of QoI sensitivity in 2002 and 2003 in European vineyards, we found more resistant haplotypes in 2003–2004 than in 2000–2001, revealing an increase of the resistance during this period. Thus, the resistance frequencies are not the same everywhere and the differences found may depend on the pressure exerted by QoI fungicides and probably also on the population fitness in the absence of selection pressure.

Fitness parameters

The development and the spread of fungicide resistance depends on the fitness of resistant isolates, and knowledge of processes such as diversity, sex

Fig. 4 Dynamic changes (means±SEM) in the frequency of QoI-resistant isolates sporangia in sporangial populations harvested from grapevine leaf disks inoculated with three mixtures of QoI-sensitive COU15 and QoI-resistant sporangia PAU 32 in various proportions (20:80 (—■—), 50:50 (—□—) and 80:20 (—▲—) during eight asexual generations, assessed by bioassay or q-PCR method. The second sporulation cycle was initiated with sporangia resulting from the initial infection and subsequent sporulation cycles were conducted accordingly. Each point is mean of six replicates



evolution and fungicide pressure is essential to try to prevent and/or to control the diseases better. For this, it is important to understand how fitness shapes the selection of individuals in nature under different selection pressure. From various sensitive or QoI resistant isolates belonging to different mitochondrial haplotypes, we measured fitness parameters without fungicide selection pressure. A major point should be made: resistant isolates are as fit as sensitive isolates, with regard to sporangia production, latent period and infection frequency in asexual cycles. Only infection frequency of resistant isolates was significantly higher than in sensitive isolates ($P=0.02$). As the resistant isolates belonged essentially to haplotype I, it was possible that the difference was due in part to the belonging to the haplotype I group. A comparison between the fitness of haplotypes I and II inside sensitive group, or with the totality of isolates, including the resistant isolates, showed no significant difference in the spore production ($P=0.75$ and 0.24), the latent period ($P=0.36$ and 0.35), or the

fitness index ($P=0.86$ and 0.10). Only infection frequency was significantly more important for haplotype I ($P=0.03$) and when QoI-resistant isolates were considered. As above, the significance of the infection frequency could well be related to the QoI resistance.

From this first study on the fitness parameters, we were thus able to conclude that the presence of G143A SNP in cytochrome b gene has no deleterious effect on growth parameters observed under controlled conditions and without selection pressure.

However, the overall fitness of one population relative to another would be difficult to predict solely on the basis of knowledge of fitness components. For this reason, the combination of different parameters would reasonably approximate overall fitness in calculating a composite fitness index. The fitness index described here, based on infection frequency, spore production and latent period enabled us to show that there was no significant difference between groups of haplotypes I and II and between sensitive

and QoI resistant isolates. This index also revealed a good correlation with spore production suggesting that under our experimental conditions spore production could be a sufficient measure to assess the fitness of isolates. This F_1 based on growth parameters seems adequate to standard conditions, but one of its weaknesses is certainly that it does not take in account survival capacity under less favourable environmental conditions, or fitness potential of the sexual cycle (*i.e.* oospore production, overwintering).

As with other studies on the fitness of oomycetes, such as *Phytophthora nicotianae* or *P. infestans* resistant to metalaxyl or mefenoxam (Hu et al. 2008; Kadish and Cohen 1988), QoI resistance did not show reduced fitness. However, it is possible that resistance cost might only become apparent under a specific set of environmental conditions which were not encountered in the experimental set-up, or that the associated antagonistic pleiotropy might not be detectable (Rosenberg 2001); or, yet again, that a fitness deficit linked to a resistance cost can be compensate for after numerous generations by different compensatory mechanisms (Anderson 2005; Cowen et al. 2001). One example of resistance cost due to environmental conditions was metalaxyl-resistant isolates of *Plasmopara viticola* that exhibited reduced fitness to grape leaves, but only at high temperature (Piganeau and Clerjeau 1985). A preliminary study performed under controlled conditions in our laboratory did not show differences between sensitive and resistant QoI isolates at 15°C or 28°C.

In connection with definite F_1 , we estimated competitiveness of sensitive and resistant pairs of isolates. The follow-up during 8 cycles of asexual reproduction showed that, in the absence of selection pressure, resistant isolates can compete with sensitive isolates in mixed inoculation depending on their fitness parameters. Thus, a resistant isolates with a lower F_1 (PAU32) than the sensitive isolates (COU 15) tends to disappear after eight cycles, while a resistant isolate (MIC 128) with a high F_1 preserves even tends to increase after eight cycles. These results were reinforced by other isolate pairs tested previously, where a resistant isolate with a higher F_1 (PIC59, $F_1=2.75$) than the sensitive isolate FEM103 ($F_1=2.11$) increased rapidly to reach 100% of resistant isolate in the whole mix after the fifth cycle. In the same way, another mix with PAU 32 ($F_1=1.57$) and a sensitive strain MIC 103 ($F_1=1.77$) also showed

a decrease in the presence of PAU 32 from the fourth cycle (Abadie 2007).

Globally the competitiveness tests performed were coherent with the estimated parameters of the fitness and our F_1 , although imperfect, enabled us to obtain a good idea of the capacities of isolate survival under controlled conditions. In accordance with Kadish and Cohen (1988), we showed that the pattern of changes in frequency of resistant isolates could be largely dependent on fitness parameters in laboratory conditions. During the competitiveness assays, we used the bioassay or the q-PCR method, the curves of competitiveness (Figs. 3 and 4) showed some differences, although tendencies were similar. The bioassay seemed to facilitate the presence of resistant isolates (R1 and R2). One possible explanation could be that the method of q-PCR is strictly quantitative and applies directly to spores harvested after each asexual cycle, while the bioassay required an additional cycle in the presence of famoxadone, facilitating the growth of resistant isolates and potentially integrating others fitness parameters. Thus, the quantification of the percentage of resistant isolates based on reference curves in the presence of famoxadone in the bioassay could lead to a slight overestimation of the presence of resistant isolates compared to q-PCR carried out without fungicide pressure. However, the faster, easier q-PCR method is an adequate method to estimate the proportion of resistant isolates.

As with the analysis of fitness parameters, the competitiveness assays strengthened the idea that the presence of G143A mutation would have no deleterious effect on *P. viticola* under controlled conditions without fungicide selection pressure. As all resistant isolates used in this study have already been sequenced (Chen et al. 2007) and possessed only the G143A SNP, which is the most frequent, we would suggest that the G143A mutation does not induce a resistance cost in *P. viticola*. However, Fisher et al. (2004) have investigated the impact of the introduction of G143A SNP on bc complex activity of *Saccharomyces cerevisiae* and shown that it has little effect on the enzyme activity. In contrast, the association of the G143A with F129L, or other mutations, led to various deleterious effects on enzyme activity. It would be useful to assess the resistance cost of different mutations (*i.e.* G143A and F129L) in the laboratory, to understand why the

F129L SNP was less frequent in *P. viticola* populations than in other pathogen populations.

The management of pesticides in the vineyard requires to a better understanding of how the resistance takes hold, spreads and is maintained. Important questions about the adaptation of QoI resistance are: how does QoI resistance develop in the vineyard? What is the probability of obtaining various combinations of SNPs, and what is the consequence on population fitness? In view of the importance of the development of QoI-resistance over the past decade, today these products are never applied alone and are little present in current formulations or, if they are, they are then associated with other fungicides. It would be interesting to follow the development of QoI resistance under various selection pressures and survey the development of the different SNPs in the vineyard and to study their fitness in laboratory conditions. Understanding the development of QoI resistance in the vineyard is not easy. Data obtained in vineyard in Brazil on a trial site exhibiting 100% frequency of G143A in *P. viticola* populations showed that after stopping QoI treatment for 3 years, the frequency returned to 1% in 2002, suggesting a multiannual instability of the resistance. In contrast, five subsequent applications of QoI fungicide sprays increased the frequency again to 100% within one season, immediately producing a resistant population (Sierotzki et al. 2008). In addition, a survey of the development of QoI resistance in different sites in French vineyards with few resistant isolates (less than 10%) showed the maintenance of QoI resistance in sites without QoI treatment during the growing season (Corio-Costet et al. 2006, 2008). These studies suggest that the resistant isolates possess rather good one fitness during the growing season (asexual cycle), but that the fitness of QoI resistant populations could be less good during the sexual phase and/or without selection pressure. Therefore, the contribution of sexual reproduction to global fitness might play an important role in maintaining QoI resistance. Since the cytochrome *b* gene is coded by the mitochondrial genome, it most likely depends on mitochondrial inheritance. After sexual reproduction, the level of resistant allele might decrease, depending on the mating type carrying the resistant allele, and/or the sexual fitness, and could explain contrasted results obtained in fields after sexual or asexual cycles.

The possibilities of combating QoI resistance in *P. viticola* by mixing QoIs with other fungicides, or stopping the use of QoI fungicides for a few years in order to diminish resistance after each annual sexual cycle are currently solutions used by wine growers. The application of a QoI mixed with other fungicides does not seem to eliminate selection pressure, but delays it compared to the application of QoI fungicide alone (Toffolatti et al. 2007). From a practical point of view, care should be taken not to use QoI fungicides again on plots of land having presented QoI resistance during the growing season, or then to preserve products containing QoIs for rare or selective applications during very strong epidemic pressure, and by alternating treatments with fungicides possessing different mode of action.

In conclusion, the mitochondrial haplotype II is little present in *P. viticola* populations and does not seem to have repercussions on resistant populations. Resistance can be very variable according to the vineyard under consideration and the selection pressure exerted. During the experiment under controlled conditions, we did not detect a significant difference of fitness either between 23 resistant and sensitive isolates, or between haplotypes I and II. The composite fitness index used here may help us to classify isolates according to different phenotypic and genotypic traits (*i.e.* fungicide resistance, mating-type, aggressiveness) and to have them compete according to several parameters of fitness, or used to carry out studies on the efficacy of alternative methods (*i.g.* elicitors, breeding, biological fight) on specific population or isolates. It would also be useful to estimate the survival potential of resistant isolates exhibiting single, double or triple resistance to fungicides (*i.e.* QoI, CAA and/or phenylamide fungicides), already encountered in the vineyard; but that would require including parameters of overwintering, and of capacity of sexual reproduction, to be used under field conditions. A study of fitness of the resistant isolates during the sexual cycle would be necessary to complete this work and to acquire better understanding of QoI resistance evolution under various pressures of selection.

Acknowledgements We thank D. Gobbin and colleagues from IFV for their help in sampling of the collection and Aquitaine Region Government for their financial support. We thank S. Gambier, S. Richart-Cervera, and L. Douence for technical support. We thank J-L. Genet from Dupont Protection for the gift of famoxadone.

References

- Abadie, P. (2007). Adaptation du mildiou de la vigne à la pression fongicide: étude du fitness. MSc thesis of Genetic and Plant Development. Bordeaux University. pp. 20.
- Anderson, J. B. (2005). Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews Microbiology*, *7*, 547–556.
- Antonovics, J., & Alexander, H. M. (1989). The concept of fitness in plant-fungal pathogen systems. In W. E. Fry & K. J. Leonard (Eds.), *Plant disease epidemiology* (pp. 185–214). New-York: Mc Graw-Hill.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, J., & Parr-Bobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, *58*, 649–662.
- Baudoin, A. I., Olaya, G., Delmotte, F., Colcol, J. F., & Sierotzki, H. (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.
- Chen, W.-J., Delmotte, F., Richard Cervera, S., Douence, L., Greif, C., & Corio-Costet, M.-F. (2007). At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied Environmental Microbiology*, *73*, 5162–5172.
- Collina, M., Landi, L., Guerinin, P., Branzanti, M. B., & Brunelli, A. (2005). QoI resistance of *Plasmopara viticola* in Italy: biological and quantitative real-Time PCR approaches. In H. W. Dehne, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russell, & H. Lyr (Eds.), *Modern fungicides and antifungal compounds IV* (pp. 81–88). Hampshire: BCPC.
- Corio-Costet, M. -F., Delmotte, F., Martinez, F., Giresse, X., Raynal, M., Richart-Cervera, S., et al. (2006). Resistance of *Plasmopara viticola* to QoI fungicides: origin and diversity. Paper presented at the 8th Int. Conf on Pest and Diseases 2006, pp 612–620, AFPP Eds, CD-Rom.
- Corio-Costet, M. -F., Martinez, F., Delmotte, F., Douence, L., Richart-Cervera, S., & Chen, W. -J. (2008). Resistance of *Plasmopara viticola* to QoI fungicides: Origin and diversity. In H. W. Dehne, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russell, & H. Lyr (Eds.), *Modern fungicides and Antifungal compounds V* (pp. 107–112). Braunschweig: DPG Selbstverlag.
- Cowen, L. E., Kohn, L. M., & Anderson, J. B. (2001). Divergence in fitness and evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, *183*, 2971–2978.
- Fisher, N., Brown, A. C., Sexton, G., Cook, A., Windass, J., & Meunier, B. (2004). Modeling the Q_o site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b. *European Journal of Biochemistry*, *271*, 2264–2271. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04169.x.
- Furuya, S., Suzuki, S., Kobayashi, H., Saito, S., & Takayanagi, T. (2009). Rapid method for detecting resistance to QoI fungicides in *Plasmopara viticola* populations. *Pest Management Science*, *65*, 840–843.
- Galet, P. (1977). Mildiou. In P. Galet (Ed.), *Les maladies et les parasites de la vigne* (pp. 89–222). Montpellier: Paysan du midi.
- Genet, J.-L., Steva, H., Vincent, O., & Cazenave, C. (1997). A method for measuring the level of sensitivity of *Plasmopara viticola* populations to cymoxanil. *EPPO bulletin*, *27*, 217–225.
- Genet, J.-L., Jaworska, G., & Deparis, F. (2006). Effect of dose rate and mixture of fungicides on selection for QoI resistance in populations of *Plasmopara viticola*. *Pest Management Science*, *62*, 188–194. doi:10.1002/ps.1146.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, H., & McCaffery, A. (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*, *58*, 859–867.
- Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A., & Gisi, U. (2006). Cytochrome b structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science*, *62*, 465–472.
- Heaney, S. P., Hall, A. A., Davies, S. A., & Olaya G. (2000). Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives. In *Proc. Brighton Conf. Protec Conf. Pest and diseases* (pp. 755–764). Farham: BCPC.
- Hu, J. H., Hong, C. X., Stromberg, E. L., & Moorman, G. W. (2008). Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. *Plant Pathology*, *57*, 728–736. doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01831x.
- Jordan, D. B., Livingston, R. S., Bisaha, J. J., Duncan, K. E., Pember, S. O., Piccollelli, M. A., et al. (1999). Mode of action of famoxadone. *Pesticide Science*, *55*, 105–108.
- Kadish, D., & Cohen, Y. (1988). Competition between metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in the absence of metalaxyl. *Plant Pathology*, *37*, 558–564.
- Magnien, C., Micoud, A., Glain, M., & Remuson, F. (2003). QoI resistance of downy mildew-monitoring and tests 2002. Paper presented at the 7th Int. Conf. on Pest and Diseases 2003, 8 pages. AFPP Eds, CD-Rom.
- Montarry, J., Glais, R., Corbiere, R., & Andrivon, D. (2008). Adaptation to the most abundant host genotype in an agricultural plant-pathogen system-potato late blight. *Journal of Evolution Biology*, *21*, 1397–1407. doi:10.1111/j.1420-9101-2008.01557.x.
- Piganeau, B., & Clerjeau, M. (1985). Influence différentielle de la température sur la germination de sporocyste et la sporulation des souches de *Plasmopara viticola* sensible et résistantes aux phénylamides. In *Fungicides for Crop Protection. BCPC monograph*, *31*, 327–330.
- Pringle, A., & Taylor, J. W. (2002). The fitness of filamentous fungi. *Trends in Microbiology*, *10*, 474–481.
- Rosenberg, S. M. (2001). Evolving responsively: adaptive mutation. *Nature Review Genetic*, *2*, 504–515.
- Sierotzki, H., Kraus, N., Assemat, P., Stanger, C., Cleere, C., Windass, J., et al. (2005). Evolution of resistance to QoI fungicides in *Plasmopara viticola* populations in Europe. In H. W. Dehne, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russell, & H. Lyr (Eds.), *Modern fungicides and Antifungal compounds IV* (pp. 73–80). Hampshire: BCPC.
- Sierotzki, H., Kraus, N., Pepin, S., Ferandes, N., & Gisi, H. (2008). Dynamics of QoI resistance in *Plasmopara viticola*. In H. W. Dehne, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russell, & H. Lyr (Eds.), *Modern fungicides and antifungal compounds V* (pp. 151–157). Braunschweig: DPG Selbstverlag.
- Sirven, C., & Beffa, R. (2003). Resistance to fenamidone: monitoring by real-time quantitative PCR on *Plasmopara viticola*.

- para viticola*. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 56, 523–5332.
- Toffolatti, S. T., Serrati, L., Sierotzki, H., Gisi, U., & Vercesi, A. (2007). Assessment of QoI resistance in *Plasmopara viticola* oospores. *Pest Management Science*, 63, 194–201.
- Tooley, P. W., Sweigard, J. A., & Fry, W. E. (1986). Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* from sexual and asexual populations. *Phytopathology*, 76, 1209–1212.
- Vanderplank, J. E. (1982). *Host-pathogen Interactions in plant disease* (p. 27). New-York: Academic.
- Wong, F. P., & Wilcox, W. F. (2000). Distribution of baseline sensitivities to azoxystrobin among isolates of *Plasmopara viticola*. *Plant disease*, 84, 275–281.
- Zolan, M. E., & Pukkila, P. J. (1986). Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular Cell Biology*, 6, 195–200.

PUBLICATIONS DANS DES REVUES SCIENTIFIQUES EN RAPPORT AVEC LA THESE :

Dufour M-C., Corio-Costet M-F. 2011 Sensitivity of biotrophic pathogens of grapevine (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*) to acibenzolar-S methyl and two phosphonates. **Pest Management Science**, soumis.

Dufour M-C., Lambert C., Bouscaut J., Merillon J. M., Corio-Costet M-F. 2011. Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*). **Plant Pathology**, soumis.

Dufour M-C., Fontaine S., Montarry J., Corio-Costet, M-F. (2011). Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. **Pest Management Science**, 67: 60-69

Corio-Costet M-F., Dufour M-C., Cigna J., Abadie P., Chen W.J. (2011) Resistance of *Plasmopara viticola*: diversity and fitness of resistant isolates to QoI fungicides. **Eur. J Plant Pathol**, 129: 315-329.

Corio-Costet M-F., Dufour M-C., Cigna J., Abadie P., Chen W-J. (2011) Resistance of *Plasmopara viticola*: diversity and fitness of resistant isolates to QoI fungicides. In: *The downy Mildews- Biology, Mechanisms of Resistance and Population Ecology*, Lebeda A., Holmes G.J., Mauch-Mani B. and Jeger M.J (eds). Springer, 2011, p 183-197.

CHAPITRE D'OUVRAGE :

Corio-Costet M-F., Dufour M-C., Cigna J., Abadie P., Chen W-J. (2011) Resistance of *Plasmopara viticola*: diversity and fitness of resistant isolates to QoI fungicides. In: *The downy Mildews- Biology, Mechanisms of Resistance and Population Ecology*, Lebeda A., Holmes G.J., Mauch-Mani B. and Jeger M.J (eds). Springer, 2011, p 183-197.

COMMUNICATIONS DANS DES CONGRES :

Notes ou articles

Dufour M-C., Fontaine S., Micoud A., Corio-Costet M-F. (2009) Mise au point d'outils de Q-PCR pour la détection et la quantification des deux groupes génétiques (A et B), de la résistance aux DMIs et aux QoIs chez l'oïdium de la vigne. **AFPP, 9^{ème} Conférence Internationale sur les maladies des plantes** (Tours, 4-5 décembre), p 660-669. CD-Rom.

Corio-Costet M-F., Dufour M-C., Cigna J., Abadie P., Chen W-J. (2009) Résistance de *Plasmopara viticola* aux fongicides QoIs: variabilité et compétitivité. **AFPP, 9^{ème} Conférence Internationale sur les maladies des plantes** (Tours, 4-5 décembre), p 630-639. CD-Rom.

Dufour M-C., Druelle L., Sauris P., Taris G., Corio-Costet M-F. (2009) Efficacités de stimulateurs de défenses des plantes (BTH et phosphonates) sur l'oïdium et le mildiou de la vigne : impact de la diversité des pathogènes. **AFPP, 9^{ème} Conférence Internationale sur les maladies des plantes** (Tours, 4-5 décembre), p 526-535. CD-Rom.

Corio-Costet M-F., Sombardier A., **Dufour M-C.**, Blancard D. (2009) Situation de la résistance de l'oidium du fraisier (*Podosphaera aphanis*) aux fongicides DMIs en France. **AFPP, 9^{ème} Conférence Internationale sur les maladies des plantes** (Tours, 4-5 décembre), p 621-629. CD-Rom.

Corio-Costet M-F., **Dufour M-C.**, Cigna J., Abadie P., Chen W-J. (2010) Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides., **Proc. 6th Int. workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew** (Bordeaux, July 4-9), Pp 72-74

Dufour M-C., Fontaine S., Montarry J., Corio-Costet MF (2010) Determination of genetic groups and DMI resistance of *Erysiphe necator* in field samples by a real-time PCR assay. Pp 184-186, **Proc. 6th Int. workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew** (Bordeaux, July 4-9).

Dufour M-C., Bouscaut J., Corio-Costet M.F. (2008) Impact of grapevine downy and powdery mildew diversity on the efficacy of phosphonate derivatives described as stimulators of plant defences. *J Plant Pathol*, **90**, (2, supplement), 31.8, p S2.137.

Dufour M-C., Corio-Costet M. F. 2011. Impact of grapevine downy and powdery mildew on efficacy of phosphonate derivatives (Fosetyl-Al and PK2) described as stimulators of plant defences. **IOBC/WPRS Bulletin "Induced Resistance in Plants against Insects and Diseases"**, Granada (Spain), 12– 16/05, in press.

Posters

Dufour M-C., P. Abadie, D. Lafarge, J. Montarry, M-F Corio-Costet (2008) Etude de la diversité et de la compétitivité de parasites obligatoires de la vigne (*Plasmopara viticola* et *Erysiphe necator*) : méthodes de PCR quantitatives. **Journée Jean Chevaugnon, Mycologie Aussois**, (France) **20-24 / 01**.

Dufour M-C., Corio-Costet M-F. (2009) Impact of grapevine downy and powdery mildew diversity on efficacy of phosphonate derivatives (fosetyl-AL and fertilizer PK2) and salicylic acid (BTH) described as stimulators of plant defences. **IOBC working group, PR-IR 2001 : "Induced resistance in plants against insects and diseases"** Granada (Spain), 12-16 / 05, (Résumé + poster).

Dufour M-C., Lambert C., Mérillon J-M., Corio-Costet M-F.. (2010), Responses of *Vitis vinifera* to *Plasmopara viticola* after elicitation with different plant stimulators/efficacy, gene expression and stilben production. **Oomycete Molecular Genetics Network meeting**, Toulouse (France) 6-8 / 06. P 99.

Corio-Costet MF, **Dufour M-C.**, Cigna J., Abadie P., Martinez F., Chen W-J. (2010), Resistance of *Plasmopara viticola* to QoI fungicides: origin, diversity and fitness. **Oomycete Molecular Genetics Network meeting**, Toulouse (France) 6-8 / 06. P 88.

Dufour M-C., Lambert C., Bouscaut J., Mérillon J-M., Corio-Costet M-F. (2011) Effect of BTH on grapevine plant defence in presence of different obligate pathogens (*Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*). **Symposium "Biocontrol of grapevine diseases"**. Toulouse (France), 26-27 / 05. Award for best presentation 1st price for poster communications.

Dufour M-C., Lambert C., Bouscaut J., Mérillon J-M., Corio-Costet M-F. (2011) Effect of BTH on grapevine plant defence in presence of different obligate pathogens (*Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*). **PR-Proteins and induced Resistance against pathogens and insects.** Neuchâtel (Suisse), 4-8 / 09.

Conférence orales

Corio-Costet M-F., **Dufour M-C.**, Cigna J, Abadie P, Martinez F., Chen W-J. (2008) Resistance of *Plasmopara viticola* to QoI fungicides : origin, diversity and fitness. **9th Int. Congress of Plant Pathol. (August 24-29, Torino, Italy).**

Dufour M-C., Bouscaut J., Corio-Costet M-F. (2008) Impact of grapevine downy and powdery mildew diversity on the efficacy of phosphonate derivatives described as stimulators of plant defences. **9th Int. Congress of Plant Pathol. (August 24-29, Torino, Italy).**

Dufour M-C., Corio-Costet M-F. (2010) Comparison of phosphonates derivatives (fosétyl-Al, PK2) efficacy to that of BTH as grapevine defence elicitors against *Plasmopara viticola*. **6th Int. Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew (Bordeaux, 4-9 july, 2010).** (orateur M-C. Dufour)

Dufour M-C., Lambert C., Bouscaut J., Mérillon J-M., Corio-Costet MF (2011) Efficacy in the vineyard of two plant defense stimulators against *Plasmopara viticola* : epidemic, molecular and biochemical approaches. Symposium “Biocontrol of grapevine diseases” (Toulouse, 26-27 may). **Symposium “Biocontrol of grapevine diseases” (Toulouse, 26-27 may).** (orateur M-C. Dufour)

Dufour M-C., Lambert C., Cluzet S., Merillon J-M., Corio-Costet M-F., (2011) What tools used to acquire a better understanding of induced resistance after elicitation and/or infection from laboratory to field experiments? **PR-Proteins and induced Resistance against pathogens and insects (Neuchâtel, Suisse, 4-8 september).** (orateur MF Corio-Costet).

PUBLICATIONS DANS DES REVUES SCIENTIFIQUES HORS THESE :

Sombardier A., **Dufour M-C.**, Blancard D., Corio-Costet M-F. 2009. Sensitivity of *Podosphaera aphanis* isolates to DMI fungicides: distribution and reduced cross-sensitivity. **Pest Management Science**, 66: 35-43. (Publication d'excellence du département SPE en 2010).

Jarriault D., Barrozo R., Jose de Carvalho Pinto C., Greiner B., **Dufour M-C.**, Masante-Roca I., Gramsbergen J. B., Anton S., Gadenne C. 2009. Age-dependent plasticity of sex pheromone response in the moth, *Agrotis ipsilon*: combined effects of octopamine and juvenile hormone. **Hormones and Behavior**, 56: 185-191.

