

# Réunion "Oomycètes"

Clermont-Ferrand

14-15 Juin 2005



Institut National de la Recherche Agronomique



**Réunion « Oomycètes »**  
**INRA Clermont-Ferrand**  
**Programme des 14 – 15 juin 2005**

**Mardi 14 juin**

8h00 - 8h30 Accueil (Salle de réunion L. Gachon, Domaine de Crouelle)

8h30 – 10h30

Présentation de l'Unité Mixte de Recherche « Amélioration et Santé des Plantes ». **Gilles Charmet**

Epidémiologie de *Bremia lactucae* dans des cultures sous abri. **Brigitte Maisonneuve**

Evolution d'une population de *Plasmopara halstedii* sous différentes pressions de sélection (alternance, pyramidage et assemblage de gènes *Pl*). **Denis Tourvieille**

Diversité et évolution de la résistance aux fongicides de mildiou de la vigne. **Wei-Jen Chen**

Structuration des populations de *Phytophthora infestans* par des variétés de pommes de terre présentant différents niveaux de résistance. **Josselin Montarry**

10h30 – 11h00 Pause café

11h00 – 12h30

Sélection du tournesol pour une résistance durable à ses principaux pathogènes. **Felicity Vear**

Cartographie génétique comparée et clonage de gènes et QTL de résistance à *Plasmopara viticola* et à *Uncinula necator*. **Emilce Prado**

Plateforme de phénotypage à haut débit pour l'étude de la résistance à *Plasmopara viticola* et *Uncinula necator*. **Sabine Merdinoglu**

Activités de recherche relatives aux pathosystèmes Solanacées / *Phytophthora*. **Véronique Lefebvre**

12h30 – 13h30 Repas sur le site de Crouelle

13h30 – 15h30

La résistance liée à l'âge des plantes vis-à-vis de *Phytophthora* : Caractérisation d'une forme de mort cellulaire activée chez *P. parasitica* lors de l'interaction avec *Nicotiana tabacum*. **Eric Galiana**

La résistance liée à l'âge des plantes vis-à-vis de *Phytophthora* : étude des fonctions extracellulaires chez *Nicotiana tabacum*. **Marie-Pierre Rivière**

Analyse de l'expression des gènes de *Plasmopara viticola* impliqués au cours de son interaction avec la vigne. **Pere Mestre**

Mobilisation des défenses de la vigne au cours de son interaction compatible et incompatible avec *Plasmopara viticola*. **Anne Poutaraud**

15h30 – 16h00 Pause

16h00 – 17h30

Recherche de variabilité moléculaire chez *Plasmopara halstedii*. Etat des lieux. **Jeanne Tourvieille**

Point sur la production et l'exploitation de banques ADNc de *Plasmopara viticola*. Etat des lieux et projets au sein du groupe Oomycètes. **Charles Greif**

17h30 Départ pour les Estives

## **Mercredi 15 juin**

9h00 Accueil sur le Domaine de Crouelle

9h15 – 11h30 Visites des essais Mildiou et des Installations « Parasite de quarantaine » **Frédéric Serre** et **Pascal Walser**

11h30 – 12h15 Repas sur le site de Crouelle

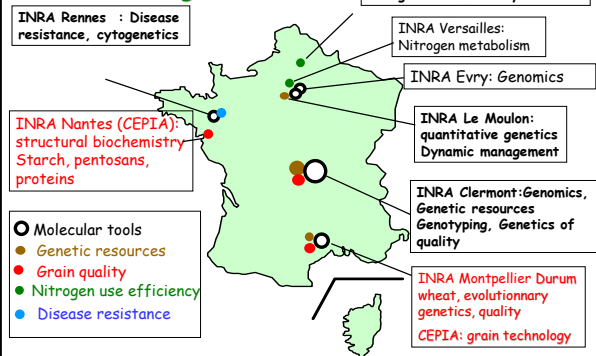
UMR 1095 ASP  
234 av. du Brézat  
63100 Clermont-Ferrand

Mixed Research unit INRA- University Blaise Pascal :

**Plant Breeding and Plant Health**



**INRA Wheat Genetics and Breeding network**



**UMR-ASP Domaine de Crouelle**

• ... History

- 1926 : Centre de Recherches du Massif Central : agronomy, crop breeding, fruit-trees
- 1946 : INRA- Plant Breeding Station
- 1999 : Founding of Mixed UnitCréation: 2 INRA units, Pl Breed. + Mycology, 1 University Lab (OVGV)  
→ 2 sites : Crouelle & les Cézeaux
- 2003: renewing for 4 years

**UMR-ASP Domaine de Crouelle**

• ... Missions

- Develop basic knowledge in Genetics and plant biology to promote application in plant improvement, plant disease control and fungus cultivation.
- Integrate biological science to improve plant breeding efficiency. Validate scientific and technical progresses by creating new wheat cultivars more adapted to sustainable agriculture (i.e. with lower inputs and higher quality).
- Preserve biological resources: seed collections, DNA libraries (ESTs, BACs...), plant resources of scientific interest (e.g. aneuploid lines, deletion lines, recombinant mapping populations...)

**UMR-ASP Domaine de Crouelle**

□ Plant species studied ...

➤ Cereals:  
Bread wheat



Triticale



Barley



**UMR-ASP Domaine de Crouelle**

□ Plant species studied

□ Maize (stopped in 2005)



Sunflower: pyramiding of major genes and QTLs for durable resistance to mildew

## UMR-ASP Domaine de Crouelle

### • ... Also an edible fungus

#### > Truffel,

co-evolution of oak  
and mycorrhizal truffel  
Development of molecular  
Markers for *T. melanospora*  
Identification and  
population genetics



• In recent years, focus of effort on  
bread wheat

## UMR-ASP Domaine de Crouelle

### ➤ Means and facilities :

#### ➤ Humans :

- # 90 permanent staff among which # 36 scientists, university profs et ingeniors
- # 6 temporary staff (e.g. Genoplante...)
- # 6 PhD and Post-docs., 15-20 students/year in Licence/Master

#### ➤ Financial

Budget fonctionnement + équipt # 800 kEuros  
# 60% INRA, 40% contracts (Génoplante, FSOV, Promosol...)

## UMR-ASP Domaine de Crouelle

### • Technical facilities

> Labs, secretary, library, informatics

#### > Plateforms:

- \* Cereal technology (rheology)
- \* Glasshouse and growth chambers
- \* Proteomics
- \* Genetic Resources Center
- \* Bioinformatics
- \* High-throughput genotyping (SSR, SNPs)

..> Experimental unit: 90 ha, field nurseries and trials, multiplication...

## UMR-ASP Domaine de Crouelle

### Main present objectives (wheat)

- Structural and functional genomics of bread wheat (and Triticeae)
- Management and exploitation of wheat biodiversity
- Wheat quality: ecophysiology and genetics
- Proteolyse: determinants and signaling (provisional title)

## Management and exploitation of wheat biodiversity

- Co-ordinators: F Balfourier & G Charmet
- Description, structuration and management of genetic diversity: C Ravel (SNP), V Roussel (PhD), L Fen (PD), J Koenig, JC Vezine, M Dardevet (Ing)
- Base-broadening, pre-breeding: A Bouguennec (Triticale)
- Quantitative genetics & breeding: L Jestin, FX Oury, JL Joseph (trials/QTL), MR Perretant (genotyping)



## Management and exploitation of wheat biodiversity

### Goals:

- ✓ Describe the diversity at different level in relation to population history
  - ✦ Use agro-morphology, genomic SSR, EST-SSR and SNPs from candidate genes to describe and structure the collections
  - ✦ Set-up collection as key-entries for in depth evaluation (phenotyping) in relation to new breeding objectives (e.g. micronutrients, dietary fibre...)
  - ✦ Study of the range of linkage disequilibrium at various sampling level (species, landraces, adapted lines...). Identify association panels with no or known population structure for candidate gene pre-validation.
- ✓ Integration of genetic determinants in breeding strategies to speed-up programs
  - ✦ Pilot study of QTL detection feasibility in a real complex pedigree
  - ✦ Maintenance of a real-size breeding program (low-input quality wheat) for an efficient integration of new objectives (e.g. magnesium, yield-%protein relationship...)

## Wheat quality: ecophysiology and genetics

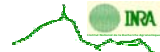
- Co-ordinators: G Branlard & E Tribouï (APAC)
- Grain development: C Girousse (APAC)
- Gene/protein expression: I Nadeau (Ing, proteomics), col J Salse (transcriptomics), C Ravel-G Boutet (RT-PCR), I Naguy, C Loussert (PhD)
- Integrative modelling: P Martre (APAC), E Tribouï (APAC)



## Wheat quality: grain development and gene expression

### Goals:

- ✓ **Understand the development of wheat grain (sink function)**
  - ✦ Histological differentiation, in relation to environmental factors (APAC)
  - ✦ Gene and protein expression during kernel development and tissue differentiation
  - ✦ Identification of key-genes determining kernel size, storage deposition (kinetics) and composition (starch, proteins, cell walls, minerals)
- ✓ **Modelling grain composition (ecophysiology & genetics)**
  - ✦ Influence of environmental factors: search for environmentally stable relationships, study of parameter sensitivity...
  - ✦ Genetic analysis of model parameters (QTL, CG), integration of genetic parameters into ecophysiology models...



## Proteolyse: determinants and signaling

- Co-ordinator: P Nicolas (Prof. UBP)
- This team of 7 assistant-professors is currently restructuring, moving from sunflower disease to another topics, in relation with grain filling and composition
- The new activity will combine model species (At, rice), bioinformatics and genomics to dissect the mechanisms involved in cell proteolyse (e.g. proteasom...), involved in either N remobilisation at grain filling or defence against pathogens...

## Structural and functional genomics of bread wheat (and Triticeae)

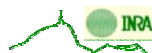
- Co-ordinators: M Bernard & C. Feuillet
- 3B-physical mapping : J Salse, P Sourdille, P Leroy, E Paux (PD), L Zhang (PhD), C Bœuf (Ing.)
- Cytogenetics: S Bernard, G Gay (Ing)
- Functional Genomics: P Barret (transfo), V Says-Lesage (mutants)



## Structure, function and evolution of the 3B chromosome of hexaploid wheat

### Goals:

- ✓ **Model for the wheat genome organization**
  - ✦ Physical to genetic relationships (recombination...)
  - ✦ Gene islands, Large scale sequencing (organization, function)
  - ✦ Linkage disequilibrium studies
- ✓ **Wheat genome evolution**
  - ✦ at the intraspecific level: comparisons with 3D (NSF) and 3A chromosomes
  - ✦ at the interspecific level: comparisons with rice, maize, sorghum, barley...
- ✓ **Gene isolation** from chromosome 3B and homoeologs
  - (38 genes involved in resistance, quality, development)
- ✓ Support **IGROW** effort in wheat genome sequencing



**Epidémiologie de *Bremia lactucae* dans des cultures de laitues sous abri**

Brigitte Maisonneuve<sup>(1)</sup>, Guillaume Baudhuin<sup>(1)</sup>, Eric Martin<sup>(1)</sup>, Claude de Vallavieille-Pope<sup>(2)</sup> et Michel Pitrat<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> INRA – Unité de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine Saint Maurice, BP94, 84143 Montfavet cedex ; <sup>(2)</sup> INRA – Unité de Pathologie végétale et Epidémiologie, BP01, 78850 Thiverval Grignon.

*Bremia lactucae* Regel est un Oomycète, parasite obligatoire qui se développe dans les zones de cultures de laitues de toutes les régions tempérées. Ce mildiou constitue l'une des principales menaces dans les cultures de laitue. Toutes les résistances génétiques utilisées depuis 40 ans ont été contournées par des souches européennes. Nous avons identifié chez *L. virosa* des résistances nouvelles. Des lignées d'introgression (ViAE et ViCQ), dans le type laitues beurre d'abri, sont résistantes à toutes les souches testées. Nous recherchons actuellement des stratégies d'utilisation de ces résistances permettant d'allonger leur durabilité. Ainsi, nous envisageons d'associer ces résistances avec d'autres résistances, tout particulièrement de mécanisme d'action différent. D'autre part, une gestion spatio-temporelle de ce matériel pourrait améliorer encore la durabilité de ces résistances.

Une stratégie en cours d'étude est l'utilisation de variétés multilignées pouvant offrir une moins forte pression de sélection pour le champignon et ainsi freiner son évolution. Pour tester cette hypothèse, mais aussi voir le comportement de notre matériel issu de *L. virosa* en culture, nous avons mené depuis 3 ans des études en tunnel plastique froid en hiver. Nous avons comparé, dans 4 répétitions par culture, l'évolution du *Bremia* dans des parcelles monovariétale de Flavona (variété ne possédant que les anciens gènes de résistance *Dm2-Dm3-Dm7*, dite sensible) à celle dans des parcelles de mélange de Flavona avec des plantes des lignées Vi. Les dates d'apparition du mildiou et l'évolution des notes d'intensité de la maladie au cours des mois de janvier et début février ont été analysées. De plus, les spectres de virulence de plusieurs isolats prélevés dans ces 3 cultures ont été établis. Afin d'identifier les souches présentes dans ces tunnels, y compris celles incapables de sporuler sur Flavona, nous avons placé chaque semaine, pendant des périodes d'une trentaine d'heures, en bordure des parcelles, des boîtes de plantules au stade cotylédons étalés ; ces boîtes, appelées boîtes pièges, sont ensuite ramenées en enceintes climatisées dans des conditions optimales pour une germination, une croissance et une sporulation du *Bremia*.

Dans les 3 cultures, aucune plante Vi n'a présenté de symptômes ; ces résistances sont donc encore incontournées. Mais les résultats sur l'évolution du mildiou sont différents entre les 3 cultures. Le premier hiver, où une contamination naturelle a été observée, la maladie a progressé lentement sur les 2 répétitions à l'extrémité sud du tunnel ; dans ces 2 blocs, l'attaque des plantes Flavona est plus lente dans les parcelles de mélange que dans les parcelles monovariétales et l'intensité est moindre (moins de feuilles contaminées par plante). Le second hiver, une forte contamination a explosé fin janvier dans tout le tunnel et il n'y avait pas de différence entre les 2 traitements de Flavona (toutes les plantes fortement attaquées). La troisième culture a été peu attaquée avec une progression lente du mildiou et un gradient nord-sud d'intensité d'attaque. Des différences de dispositifs (proportion des plantes Flavona dans les mélanges, méthode d'introduction d'un inoculum de *Bremia*) peuvent expliquer les données très différentes entre les années 2 et 3. Mais, dans les 3 années, il ne semble pas y avoir de développement en tâche de l'épidémie à partir des premiers foyers d'infection. Des études climatologiques doivent être réalisées pour essayer d'expliquer l'évolution des épidémies. D'autre part, les spectres de virulences des isolats récupérés dans les cultures, aussi bien sur les plantes en sol que dans les boîtes pièges, montrent très peu de variation à l'intérieur d'une culture.

Ces 3 cultures montrent donc une efficacité de ces résistances transférées de *L. virosa* à la laitue. Les cultures en mélange ne peuvent ralentir les épidémies que si la contamination n'est pas trop forte. Les souches de *Bremia* se maintiennent au cours de la culture sans évolution des spectres de virulence. Une étude du polymorphisme moléculaire (AFLP) de ces souches sera réalisée pour donner une meilleure appréciation de leur stabilité.

## Epidémiologie de *Bremia lactucae* dans des cultures de laitues sous abri

### *Bremia lactucae*

Oomycète parasite obligatoire  
Présent dans toutes les zones tempérées  
Grave menace pour les cultures d'abri et de plein champ



### Moyens de lutte

Lutte chimique préventive : résidus, coût, résistances  
Résistances génétiques : depuis 1960, 19 gènes identifiés

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005

## Le *Bremia* en Europe

### Evolution des souches

Contournement des 19 gènes *Dm* ou *R*  
Mais aucun isolat ne possède les 19 virulences  
Souches européennes BI: 1 à BI: 25  
Phase sexuée identifiée



### Résistances de la laitue

15 gènes localisés sur 4 linkats (7 gènes sur 1 linkat)  
Les variétés cultivées possèdent chacune 1 à 3 gènes  
Des variétés résistantes à BI: 1 à BI: 25

**Menace de souche attaquant les 19 gènes**

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005

## De nouvelles résistance introgressées de *L. virosa*

### Résistance de ViAE et de ViCQ

Non sporulation  
Efficace vis à vis de tous les isolats  
Chaque lignée : bigénique dominant



### Comment préserver ces résistances ?

Cumul de résistances de mécanismes différents  
Gestion spatio-temporelle

**Réflexions en collaboration avec Michel Pitrat**

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005

## Gestion durable des résistances au *Bremia* des Vi

### Cumul des *Rvirosa* avec certains de gènes *Dm* ou *R*

Comment choisir ces gènes?  
Ce cumul est-il garant d'une durabilité?  
Nécessité de marqueurs moléculaires des différentes résistances

### Aide au choix des gènes à cumuler

Connaissance de l'évolution des isolats de *Bremia*



Etude de la diversité des isolats européens  
et d'isolats apparus dans quelques cultures

= projet de thèse en collaboration avec  
Claire Neema

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005

## Gestion durable des résistances au *Bremia* des Vi

### Gestion spatio-temporelle

Efficacité de cultures multi-lignées (avec Claude Pope)

### Variétés multilignées

Plantes sensibles auraient un rôle de refuge pour  
le *Bremia* pour limiter le risque d'évolution



Etude en tunnel en hiver depuis 3 ans

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005

## Epidémiologie du *Bremia* dans une culture en mélange

### Comparaison du développement du mildiou dans 2 types de parcelles

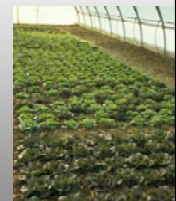
Parcelles monovariétales de Flavona (*Dm2-Dm3-Dm7*)  
Parcelle en mélange, Vi et Flavona

### Notation du mildiou sur Flavona

Dates d'apparition de sporulation  
Importance des attaques par plante

### Evolution des virulences du *Bremia*

Souches présentes dans le tunnel  
(piégeage en boîtes de plantules)  
Souches développées dans la culture



Groupe Oomycètes, 14 juin 2005



## Cultures en tunnel en hiver à Montfavet

### Dispositif expérimental

- 4 répétitions sur 1 planche nord-sud
- 5 traitements en année 1 : 2 Vi, Flavona, 2 mélanges
- 3 traitements en années 2 et 3 : Flavona, 2 mélanges

### Mélanges : $\leq 1/4$ de plantes sensibles

- Année 1 : 21 à 27 Flavona sur 96 plantes (~ 1/4)
- Année 2 : 40 Flavona sur 144 plantes (~ 1/4)
- Année 3 : 16 Flavona sur 144 plantes (1/9)

### Cultures

- Plantation début novembre
- Inoculation mi-décembre
- Récolte début février

Groupe Oomyctes, 14 juin 2005

## Inoculation par le *Bremia* des cultures en tunnel

### Année 2002-2003

- Contamination naturelle par le *Bremia* le 11 décembre : 1 plante parc 9 et 1 plante parc 20
- Répartition d'un morceau de feuille avec spores par parcelle le 17 déc

### Année 2003-2004

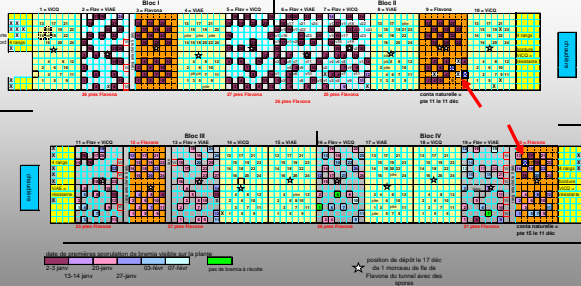
- Pas de contamination naturelle le 15 décembre
- Dépôt le 17 déc de 1 Flavona inoculée par parcelle

### Année 2004-2005

- Pas de contamination naturelle le 20 décembre
- Dépôt de 1 Flavona inoculée par parcelle
- dépôt du 21 au 23 déc puis du 7 au 13 janv

Groupe Oomyctes, 14 juin 2005

## Epidémiologie du mildiou en hiver 2002-2003



Dates d'apparition de spores sur les plantes de Flavona en 2003

Groupe Oomyctes, 14 juin 2005

## Evolution du mildiou en 2003 dans le tunnel

### Mildiou apparu en parcelles 9 et 20 (Flavona)

- Développement début janvier : quasiment toutes les Flavona des blocs I et II les 2-3 janv

- Contamination progressive entre le 13 janv et début fév des Flavona des blocs III et IV

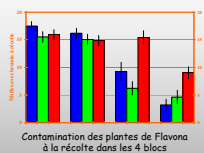
- 3 Flavona sans sporulation à la récolte le 7 février en bloc IV (parc méi)

- Pas de mildiou sur les plantes Vi

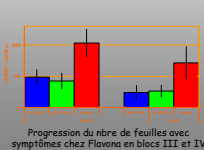
Groupe Oomyctes, 14 juin 2005

## Epidémiologie du mildiou dans le tunnel en hiver 02/03

### Résultats de février 2003

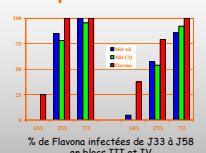


Contamination des plantes de Flavona à la récolte dans les 4 blocs

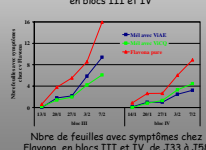


Progression du nbre de feuilles avec symptômes chez Flavona en blocs III et IV

### Pas de spores sur les Vi



% de Flavona infectées de J33 à J58 en blocs III et IV



Nbre de feuilles avec symptômes chez Flavona en blocs III et IV, de J33 à J58

Groupe Oomyctes, 14 juin 2005

## Evolution du *Bremia* dans le tunnel en hiver 02/03

### Spectres des isolats sporulés dans le tunnel

#### *Bremia* apparu en décembre

Sextet : 63 63 02 00/01

Avec qq spores de sextet 63 63 03 01

#### Isolats récoltés en février sur Flavona

Sextet de monospores : 63 31 02 00

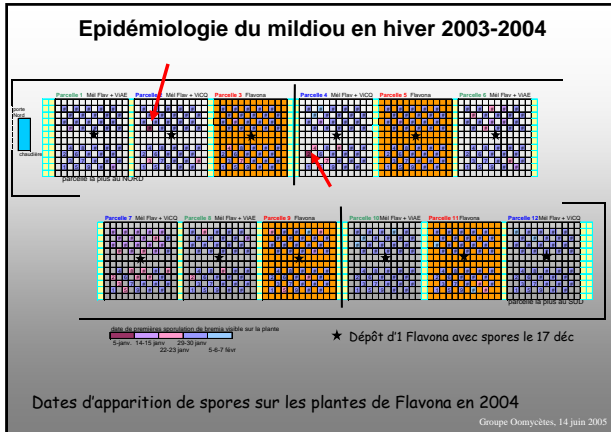
63 63 02 01

63 63 03 01

#### *Bremia* assez stable

- Variation sur 3 virulences (14, 15 et 38) dont 2 non fixées dans inoculum

Groupe Oomyctes, 14 juin 2005



### Evolution du mildiou en 2004 dans le tunnel

**Pas de contamination naturelle → inoculation au centre de chaque parcelle en décembre**

Premières contaminations 4 janv (parcelles 2 et 4 = mél)  
 Développement 14 janvier : parcelle 7 (mél) côté Est et qq plantes sur 7 autres parcelles  
 (2 parc 1 ; 1 parc 3-4-5-8-9 ; 4 parc 6)

Contamination de toutes les Flavona entre le 22 et le 29 janvier

Pas de mildiou sur les plantes Vi

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005

### Epidémiologie du mildiou dans le tunnel en hiver 03/04

**Résultats de février 2004**  
 Forte contamination des Flavona à la récolte  
 Pas de Bremia sur les Vi  
 Pas de différence entre parcelles de mélange et parcelles pures

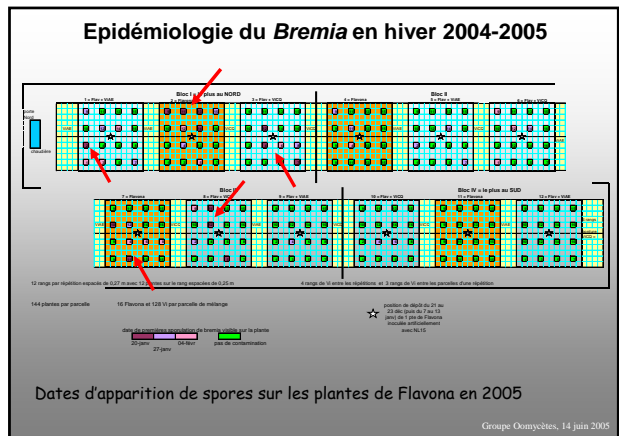
**Spectres des isolats récoltés dans le tunnel**  
 Inoculation par isolat de 2003 (sextet : 63 63 02/03 00/01)

Isolats récoltés en février sur Flavona  
 19 des 30 msp : 63 63 02 01  
 2 msp = 63 31 02 00 ; 3 msp = 63 63 02 00 ; 1 msp = 63 63 03 01 ;  
 5 hétérogènes pour vir15 ou vir38 = 63 63 02/03 00/01

Isolats en boîtes pièges  
 piégés sur Lednický (*DmI*) > 7 sur 12 isolats = 63 63 02 01  
 piégés sur Flavona > 6 sur 9 isolats = 63 63 02 01  
 Autres isolats piégés 63 63/31 02/03 00/01

Peu de variation de sextet ; pas d'évolution du *Bremia*

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005



### Evolution du mildiou en 2005 dans le tunnel

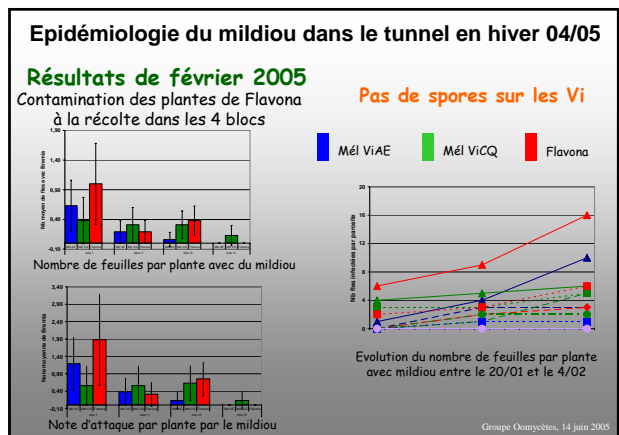
**Pas de contamination naturelle → inoculation au centre de chaque parcelle en décembre**

Premières contaminations 20 janv (parcelles 1-2-3 et 7-8) = soit 1 à 4 plantes par parcelle  
 Progression lente de la contamination fin janvier (parcelles 1 à 10 avec 1 à 6 plantes sur 16 avec spores)

Aucune contamination des parcelles 11 et 12  
 Faible contamination des parcelles 5-9-10 à la récolte (moins de 4 plantes avec spores le 4 février)

Pas de mildiou sur les plantes Vi

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005



## Epidémiologie du *Bremia* dans le tunnel en hiver 04/05

### Résultats de février 2005

- Faible contamination des Flavona à la récolte
- Pas de mildiou sur les Vi
- Gradient nord-sud dans la contamination

### Spectres des isolats récoltés dans le tunnel

Inoculation par isolat BI 15 (sexter : 31 31 00 00)

Isolats récoltés en février sur Flavona  
en cours d'étude

Isolats en boîtes pièges

piégés sur Lednický (Dm1) > 2 = 31 31 00 00 et 2 = 63 31 00 00  
piégés sur Flavona > 8 isolats = 31 31 00 00

seule variation sur viré avec des sporulations tardives et non homogènes

Développement de l'inoculum  
Pas de contamination par souche des années antérieures

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005

## Bilan des 3 années d'étude du *Bremia* dans un tunnel

### Développement du mildiou variable selon les années

- Gradient nord-sud dans 2 des 3 cultures
- Moins de mildiou dans les parcelles de mélange seulement dans 2 blocs en 02/03
- La forte contamination de 03/04 s'explique par conditions de culture
- Pas de développement en «tâche» à partir des foyers primaires

### Spectres des isolats récoltés dans le tunnel

- Contamination naturelle en 02/03
- Développement du *Bremia* inoculé (démontré en 04/05)
- Grande stabilité du *Bremia* au cours des cultures
- Pas de gain de virulence
- Seules variations pour des HD souvent hétérogènes

Pas de contamination des Vi

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005

## Perspectives de l'étude du *Bremia* dans une culture de laitues en tunnel d'hiver

### *Bremia* développés dans les cultures

- Continuer l'étude des spectres des isolats récoltés (isolats de 2005)
- Etude des isolats avec des marqueurs moléculaires neutres
- Poursuivre le piégeage des spores présentes dans l'air
- Analyse des paramètres climatiques pour expliquer l'évolution des épidémies

### Durabilité des résistances de Vi et intérêt de cultures de variétés multilignées

- Continuation des cultures en mélange dans le tunnel avec  
une faible proportion de plantes « sensibles » de Flavona  
et une inoculation « légère » en décembre en l'absence de  
contamination naturelle
- Extension de cette étude chez des partenaires

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005

## Epidémiologie de *B. lactucae* dans des cultures de laitues sous abri

### Culture et tests *Bremia* au GAFL (INRA-Montfavet)

- Brigitte Maisonneuve
- Eric Martin
- Christophe Giraud
- Guillaume Baudhuin (DESS 2004)

### Marquage moléculaire à l'INA-PG (laboratoire de C. Neema)

- Jérôme Franchel
- Julien Ratelad (Master 1, 2005)

### Appui à la réflexion scientifique

- Michel Pitrat (GAFL)
- Claude de Vallavieille-Pope (INRA-Grignon)
- Claire Neema (INA-PG)

Groupe Oomycètes, 14 juin 2005

## **Evolution d'une population de *Plasmopara halstedii* sous différentes pressions de sélection (alternance, pyramidage et assemblage de gènes *PI*).**

Denis Tourvieille de Labrouhe <sup>(1)</sup> ; Emmanuelle Mestries <sup>(2)</sup> ; Pascal Walser <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR « ASP », Institut National de la Recherche Agronomique, 234 avenue du Brézat, 63100 Clermont-Ferrand. <sup>(2)</sup> Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains, Centre de Grignon, BP 4, 78850 Thiverval-Grignon.

La mise au point d'un dispositif d'infection naturelle en conditions contrôlées a permis de suivre l'évolution du mildiou (*Plasmopara halstedii*) sous différentes stratégies de gestion des gènes *PI* de résistance monogénique du tournesol. Nous avons analysé, sur quatre années, la monoculture de gène, la combinaison de deux gènes, l'alternance et l'assemblage de génotypes différents par leurs gènes de résistance. Les monocultures de gène ont conduit à la perte d'efficacité de la résistance dès le troisième cycle de culture avec l'apparition de nouvelles virulences, et cela quel que soit le gène utilisé. Au contraire, la combinaison de gènes, l'alternance et l'assemblage permettent de préserver l'efficacité des résistances monogéniques. Les contraintes imposées aux acteurs de la filière par la mise en place de telle ou telle stratégie sont discutées.

**Mots clés :** *Plasmopara halstedii*, résistance durable, alternance, combinaison de gènes, assemblage.

Tourvieille de Labrouhe, D., Mestries, E., and Walser, P. (2005). Quelles perspectives pour la lutte génétique vis-à-vis du mildiou du tournesol ? OCL (sous presse).

INRA

# Réunion « Oomycètes »

## Evolution d'une population de *Plasmopara halstedii* sous différentes pressions de sélection

D. Tourvieille, E. Mestries, P. Walsler

1 Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

INRA

Les observations en culture

### La situation en culture

- La « monoculture » d'un gène est-elle responsable de cette évolution ?
- Comment gérer les résistances monogéniques pour une efficacité durable ?
- Contrôle durable du mildiou du tournesol

2 Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

INRA

Les observations en culture

### *P. halstedii* existe sous forme de « races physiologiques »

En France, Le mildiou est présent depuis 1966  
12 races ont été identifiées

- 4 introduites des USA
- 7 n'ont été trouvées qu'en France

Enfin, la résistance au métalaxyl, seul anti mildiou autorisé sur tournesol, est apparue en 1993

1966	100*
1988	710*
1989	703*
1993	
1995	300 700
2000	304*
2001	314*
2002	307* 704*
	304* 714*
2004	334*

\* Races reconnues installées par le SPV

3 Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

INRA

Les observations en culture

### Répartition géographique des races

L'apparition de nouvelles races pourrait dépendre :

- de la population parasitaire plus ou moins apte à fournir de nouveaux pathotypes
- des méthodes culturales : labour, rotation, ...
- des variétés les plus cultivées

Question importante : Qu'est-ce qui favorise l'apparition de nouvelles races ?

4 Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

INRA

Les observations en culture

- Une évolution très rapide du pathogène
- La « monoculture » d'un gène est-elle responsable de cette évolution ?
- Comment gérer les résistances monogéniques pour une efficacité durable ?
- Contrôle durable du mildiou du tournesol

5 Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

INRA

Les observations en culture

### Une évolution très rapide du pathogène liée à l'utilisation des gènes PI

Ceci est clairement démontré par l'observation sur le terrain

La « durée de vie » d'un gène est de quelques années seulement

6 Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

Les observations en culture

### Conclusion

L'utilisation systématique d'une unique source de résistance semble conduire irrémédiablement à sélectionner dans la population parasitaire, les individus capables de surmonter cette source (nouvelles virulences = nouvelles races). De plus cette perte de résistance concerne pratiquement l'ensemble des variétés puisque elles sont, dans leur grande majorité, construites sur les mêmes bases de résistance.

*Comme le nombre de gènes de résistance est limité et que leur introduction dans les variétés est coûteuse, quelles sont les voies possibles pour faire durer leur efficacité en culture ?*

7 Réunion Osmvèztes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

L'expérimentation mise en place


- Une évolution très rapide du pathogène
- La « monoculture » d'un gène est-elle responsable de cette évolution ?
- ✦ Gérer les résistances monogéniques pour une efficacité durable ?
- Contrôle durable du mildiou du tournesol

8 Réunion Osmvèztes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

L'expérimentation mise en place

#### Choix du matériel biologique

Hybrides isogéniques	Gènes	race 100	race 710
H1	a	R	S
H2	a + a	R	R
H3	a + b	R	R
H4	a + a + b	R	R



#### Protocole mis en place

Année	Référence	1 gène efficace (a)	1 gène efficace (b)	Pyramidage (a + b)	Alternance	Assemblage
2001	H1	H2	H3	H4	H1	H1, H2, H3, H4
2002	H1	H2	H3	H4	H2	H1, H2, H3, H4
2003	H1	H2	H3	H4	H3	H1, H2, H3, H4
2004	H1	H2	H3	H4	H4	H1, H2, H3, H4
2005	H1	H2	H3	H4	H1	H1, H2, H3, H4

Isolément d'une sous population représentative à partir d'échantillons de terre, sur une variété sans aucun gène de résistance = AIRELLE

9 Réunion Osmvèztes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

L'expérimentation mise en place

Objectifs :

Démontrer l'intérêt d'une gestion des gènes *PI* de résistance sur la durabilité des résistances.

L'évolution rapide des virulences est-elle due à la « monoculture » des gènes *PI* ?

Quel est l'impact du choix des gènes sur l'évolution de la population parasitaire ?

Est-ce que l'on peut revenir à une variété sensible après plusieurs années d'alternance ?

Les nouvelles virulences rencontrées en France ne sont-elles pas toutes des introductions de pays tiers ?

Obtenir une collection de souches sur lesquelles nous pourrions analyser le coût de la virulence sur la « fitness »

Mesurer le lien entre le niveau d'attaque l'année n avec les niveaux d'infestation du sol dus aux infections les années n-1, ...

10 Réunion Osmvèztes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

L'expérimentation mise en place

### La situation de « monoculture » de gène efficace

Des résultats comparables à ceux observés en culture

Nous avons cultivé dans des conditions très favorables au parasite, en **monoculture**, sur une parcelle contaminée et sans rotation, deux génotypes qui ne se distinguent que par leur source (gènes *PI*) de résistance à la race présente sur la parcelle.

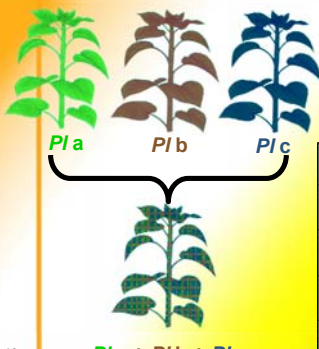
Un témoin sans résistance permet de situer la pression de la maladie.

Années	Génotype sensible	Génotype résistant source A	Génotype résistant source B
2001	71 % 710	ε -	ε -
2002	42 % 710	ε -	ε -
2003	75 % 710	5 % 704	5 % 704 et 714
2004	59 % 710	15 % 704	24 % 704 et 714

11 Réunion Osmvèztes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

L'expérimentation mise en place

### Le Pyramidage



Les souches capables de surmonter plusieurs gènes en même temps sont peu nombreuses (et a priori moins agressives) et cela d'autant plus que les gènes pyramidés sont nombreux et d'origines différentes.

Années	Génotype résistant source A	Génotype résistant source B	Génotype résistant source A + B
2001	ε -	ε -	ε -
2002	ε -	ε -	ε -
2003	5 % 704	5 % 704 et 714	ε -
2004	15 % 704	24 % 704 et 714	ε -

12 Réunion Osmvèztes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

**Implications du Pyramidage pour la filière**

- La recherche doit caractériser les gènes de résistance afin de fournir aux obtenteurs des outils (ex. marqueurs moléculaires) d'aide au pyramidage.
- Les sélectionneurs doivent convertir leur génétique en cumulant dans le même matériel plusieurs gènes *PI*, ces multiples conversions sont longues, de plus, certaines associations sont difficiles. En absence de marqueur moléculaire, les tests biologiques sont nécessaires et ceux-ci sont réalisés dans des enceintes respectant des normes sanitaires strictes (parasite de quarantaine).
- Les producteurs doivent disposer de l'information, la simple information «RM» ne suffit pas pour choisir une variété «pyramidée», puisque ce terme ne décrit pas la construction génétique, il ne fait qu'informer sur la résistance à une série de races.

13 Réunion Comycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

**L'Alternance**

Les isolats sélectionnés l'année 1 sont confrontés à un autre gène *PI* au cycle suivant.

En diversifiant la pression de sélection exercée par les gènes *PI* sur le parasite, on limite le risque de favoriser telle ou telle race

Années	Génotype résistant source A	Génotype résistant source B	Génotypes en alternance
2001	€	€	75 % 710
2002	€	€	€
2003	5 % 704	5 % 704 et 714	€
2004	15 % 704	24 % 704 et 714	€

14 Réunion Comycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

**Implication de l'Alternance pour la filière**

- La recherche doit analyser s'il est envisageable de revenir à une source de résistance contournée après plusieurs alternances.
- Les sélectionneurs doivent convertir leur génétique en démultipliant les formes de leurs matériels génétiques, afin de disposer d'une gamme de variétés diversifiée pour les résistances. Ces multiples conversions sont longues et en absence de marqueur moléculaire, les tests biologiques sont nécessaires.
- Les producteurs doivent disposer de l'information, la simple information «RM» ne suffit pas pour choisir entre variétés, celles-ci doivent être classées dans des groupes afin de favoriser l'alternance. L'idéal serait qu'ils puissent utiliser une même variété sous différentes formes.

15 Réunion Comycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

**L'Assemblage**

La diversité des gènes utilisés limite le risque de sélectionner une race plutôt qu'une autre tout en limitant l'impact économique de l'apparition d'une nouvelle race puisque celle-ci ne peut infecter qu'un pourcentage des individus.

Années	Génotype sensible	Génotype résistant source A	Génotype résistant source B	Génotype en mélange (A + B)
2001	71 % 710	€	€	14 % 710
2002	42 % 710	€	€	7 % 710
2003	75 % 710	5 % 704	5 % 704 et 714	17 % 710
2004	59 % 710	15 % 704	24 % 704 et 714	13 % 710

16 Réunion Comycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

**Implication de l'Assemblage pour la filière**

- La recherche doit mener des études pour définir le taux de plantes éventuellement sensibles qui peuvent être introduites dans l'assemblage sans risque économique.
- Les sélectionneurs doivent convertir leur génétique afin de disposer simultanément de plusieurs formes (diversifiées pour les résistances) d'une même variété. Ces multiples conversions sont longues et présentent des difficultés de gestion et d'importants surcoûts.
- Les producteurs doivent disposer de l'information, et accepter un risque « mildiou » faible, qui le protégera d'un risque mildiou fort à venir.
- La réglementation doit autoriser ce type d'assemblage, éventuellement sans traitement fongicide.

17 Réunion Comycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

**Bilan sur la population parasitaire :**

En 2000, seuls deux pathotypes étaient connus sur nos parcelles :  
La race 100 vis-à-vis de laquelle nos 4 hybrides sont résistants  
La race 710, seul H1 est sensible

En 2005, la virulence s'est fortement différenciée :  
La race 100 n'a pas été isolée  
La race 710 reste exclusive à absence de gènes de résistance et dans les parcelles d'assemblage et d'alternance  
Les pathotypes 704 et 714 apparaissent lorsqu'un gène de résistance est utilisé seul  
Les pathotypes 304 et 314 apparaissent dans le pyramidage

Les 4 nouveaux pathotypes étaient absents de la région en début d'expérimentation et n'ont pas été isolés hors de notre expérimentation  
Tous les pathotypes décrits ont déjà été isolés hors d'Auvergne : la population française semble donc héberger cette variabilité.

18 Réunion Comycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

L'expérimentation mise en place

**Perspectives d'étude :**

L'expérimentation 2005 (en cours) permettra

- \* de confirmer l'effondrement de la résistance monogénique utilisée seule.
- \* de préciser la « durabilité » de l'assemblage et du pyramidage.
- \* de définir s'il est possible de revenir à un génotype sensible après plusieurs années d'alternance

On peut analyser les liens génétiques existant entre la population indigène (mélange de race 100 et 710) et les variants isolés en 2005.

On peut analyser le coût de la virulence en comparant la « fitness » des isolats de départ (100 et 710) et les variants (304, 314, 704 et 714)

19 Réunion Comvèctes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

Faire durer la résistance au mildiou du tournesol

- Une évolution très rapide du pathogène
- La « monoculture » d'un gène est-elle responsable de cette évolution ?
- Comment gérer les résistances monogéniques pour une efficacité durable ?

♣ **Contrôle durable de la maladie**

20 Réunion Comvèctes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

Faire durer la résistance au mildiou du tournesol

**La résistance généraliste**

Son utilisation en complément des gènes *Pl*, permettrait de limiter l'extension rapide des nouvelles races en prolongeant l'intérêt agronomique de telle ou telle variété.

Les expérimentations 2003 et 2004 ont montré que cette résistance « horizontale » était héritable.

21 Réunion Comvèctes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

Faire durer la résistance au mildiou du tournesol

**Implication de la résistance généraliste pour la filière**

- ◆ La **recherche** doit explorer des méthodologies de mesure en laboratoire de cette résistance, vérifier l'absence d'adaptabilité du parasite (gain d'agressivité) et proposer des modèles de sélection.
- ◆ Les **sélectionneurs** doivent séparer dans le temps la sélection pour la tolérance et l'introduction des gènes majeurs de résistance (gènes *Pl*). L'exploitation en sélection de résistance polygénique est toujours longue et coûteuse.
- ◆ Les **producteurs** ne sont pas sûrs de pouvoir disposer de l'information, en effet, dans l'hybride commercial, la tolérance est masquée par la présence d'un ou de plusieurs gènes *Pl*.

22 Réunion Comvèctes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

Faire durer la résistance au mildiou du tournesol

**La lutte génétique doit être soutenue par les méthodes chimiques et culturales**

**Préserver l'intérêt du métalaxyl**

Depuis 1993, toutes les semences commercialisées des variétés sensibles aux races 703 ou 710 sont traitées avec du Métalaxyl. Confrontées au produit, les souches appartenant à ces races ont développé une résistance à cette molécule dont le niveau n'a cessé d'augmenter : en 2004, tous les isolats appartenant à ces deux races sont insensibles au métalaxyl.

**Un produit efficace**

Les isolats des nouvelles races apparaissent, encore, sensibles au produit, il nous faut préserver cette sensibilité en limitant l'utilisation du métalaxyl aux situations à risque.

**Une résistance réversible**

➔  **limiter au maximum l'utilisation du métalaxyl**

23 Réunion Comvèctes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

Faire durer la résistance au mildiou du tournesol

**La lutte génétique doit être soutenue par les méthodes chimiques et culturales**

**Réduire le risque « mildiou » par de bonnes pratiques culturales**

Si le taux de plantes malades dépend pour beaucoup des conditions climatiques (présence d'eau libre à la germination) et du niveau de résistance de la variété, il est démontré que le passé « mildiou » est très important puisqu'il définit le niveau d'infestation de la parcelle.

➔  **Le niveau d'infestation du sol est directement lié à la présence de plantes « mildiouées » les années n-1 et n-2**

24 Réunion Comvèctes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005



***Diversité et évolution de la résistance aux fongicides  
des populations de mildiou de la vigne***  
*Wei-Jen Chen, François Delmotte et Marie-France Corio-Costet*


INRA-Bordeaux, UMR Santé Végétale, BP 81, 33883 Villenave

*Plasmopara viticola* (Oomycètes) est le parasite obligatoire responsable du mildiou de la vigne. Il a été accidentellement introduit de l'Amérique du Nord en France en 1878. Peu après son introduction, cette maladie s'est rapidement disséminée sur le continent européen, induisant une crise économique importante pour la viticulture européenne. Le but de cette étude est de réaliser une évaluation pertinente de la biodiversité, de la structure des populations, de la phylogéographie et des mécanismes de l'évolution conduisant à l'adaptation rapide de ce pathogène à la pression fongicide, dans l'espoir d'apporter de nouvelles perspectives dans l'élaboration de stratégies de lutte contre cette maladie. Pour mener cette étude, des marqueurs moléculaires ont été développés ou/et optimisés, comprenant 3 marqueurs microsatellites (trois autres sont en cours) et un fragment mitochondrial de 2,6 kb contenant deux gènes complets (cytochrome *b*, NAD9), deux gènes partiels (ATP9 et NAD5), et trois régions inter-génique complètes. En outre, un marqueur 28S a été utilisé pour l'inférence de la phylogénie interspécifique. Les échantillons proviennent de 1556 souches issues de 57 populations européennes et de 77 isolats prélevés sur le continent américain. Les allèles de résistance situés au cytochrome *b*, gène cible des fongicides de types strobilurines ont été caractérisés et leur distribution a été étudiée.

Les principaux résultats sont les suivants : (1) depuis 1996 (date de l'homologation des strobilurines en France) les allèles de résistance conférant la résistance aux strobilurines se sont largement répandus dans tous les vignobles français ! (2) Les allèles de résistance sont apparus au moins deux fois de façon indépendante. (3) On observe un fort flux génique entre les populations à l'échelle du vignoble (grande taille de populations et/ou migration importante) (4) Les populations américaines présentent une grande diversité y compris à l'échelle interspécifique : nous avons notamment révélé l'existence de trois nouvelles (sous-)espèces de mildiou de la vigne sur ce continent. (5) L'introduction du mildiou de la vigne en Europe résulte de l'introduction de deux entités génétiques distinctes en provenance d'Amérique du Nord.

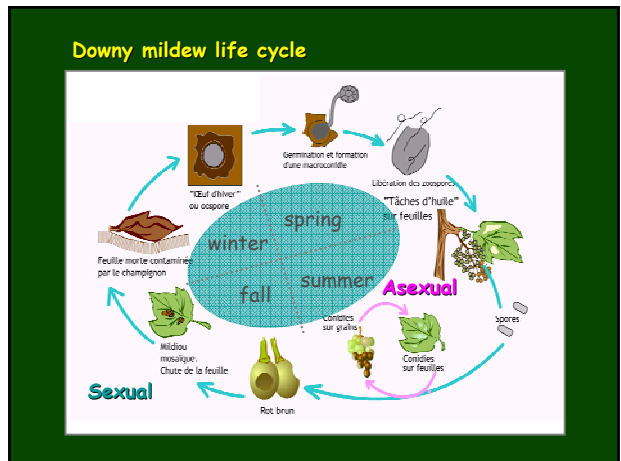
UMR Santé Végétale INRA, Bordeaux

Diversité et évolution de la résistance aux fongicides des populations de mildiou de la vigne



*Plasmopara viticola*

Wei-Jen CHEN, François DELMOTTE et Marie-France CORIO-COSTET



Etudes précédentes de « génétiques des pops » réalisées à l'aide de 4 microsates, faites par un group de recherche suisse (Gobin et al., 2003, 2004) ont montré que:


1. De nombreux génotypes probablement issus de la germination d'oospores (reproduction sexuée, contaminations primaires) apparaissent régulièrement au cours de la période végétative.
2. Les contaminations secondaires (amplification clonale) semble se disperser essentiellement à proximité immédiate du symptôme d'origine (ceps adjacents).

↳ Epidémiologie

Diversité & Biologie Evolutive

### Questions:

- Combien d'espèce chez mildiou de la vigne ?  
→ complexe d'espèces (diversité inter & intra-spécifique).
- Par quel(s) trajet(s) et quelles mécanismes de l'évolution ce pathogène est-il arrivé en Europe et ensuite s'est propagé dans la plupart des vignobles mondiaux ?  
→ Histoire d'invasion, (re)colonisation.
- Quelles sont les circonstances et les caractéristiques des nouveaux lieux qui vont adopter ou empêcher leurs persistances? Et quelles sont les conséquences de leurs actions ?  
→ Adaptation (e.x. résistance aux fongicides)



### Outils moléculaires

Marqueurs moléculaires ont été développés ou/et optimisés, comprenant 3 marqueurs **microsatellites** (trois autres sont en cours) et un fragment **mitochondrial** de 2,6 kb contenant deux gènes complets (cytochrome b, NAD9), deux gènes partiels (ATP9 et NAD5), et trois régions inter-génique complètes. En outre, un marqueur **28S** (domaine C1-C3) a été utilisé pour l'inférence de la phylogénie interspécifique.

### Echantillon taxonomique

Echantillons provenant de (1556+77\*) souches issues de (57+8\*) populations européennes et américaines\* ont été collectées pour le génotypage ou/et séquençage, puis pour les analyses.

\*Individus de l'Amérique du Nord (NY)

### Outils moléculaires - évolution de la résistance aux fongicides

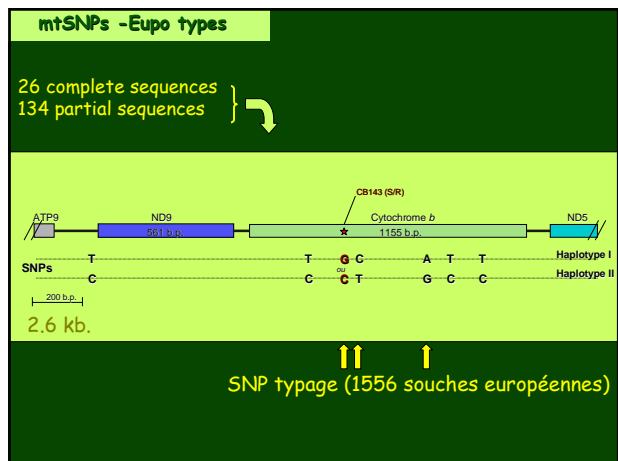
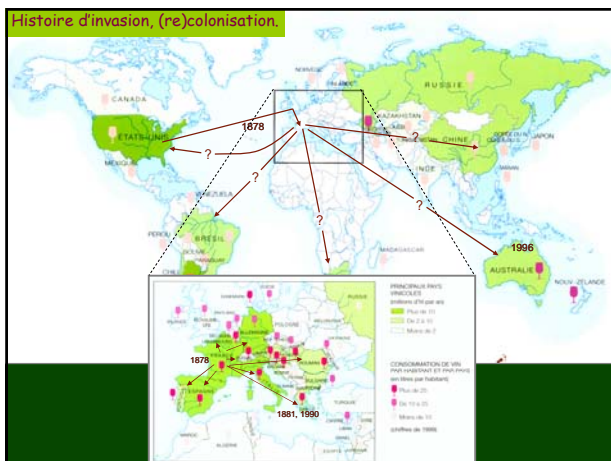
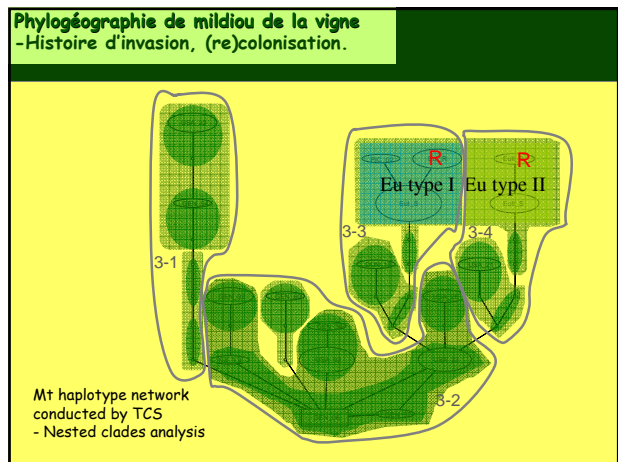
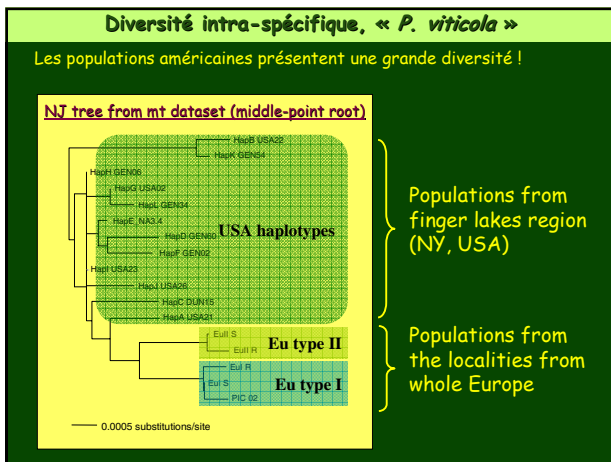
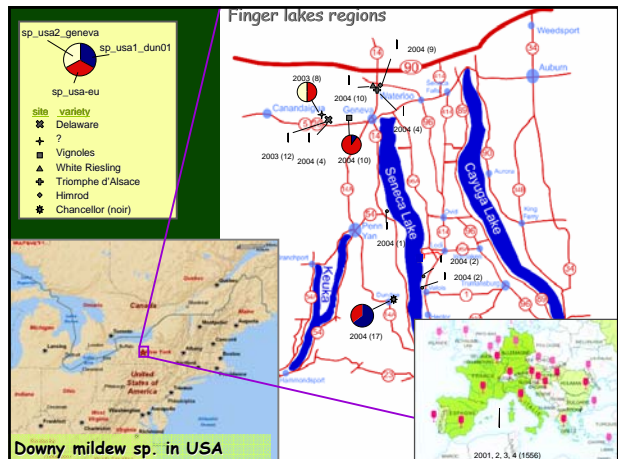
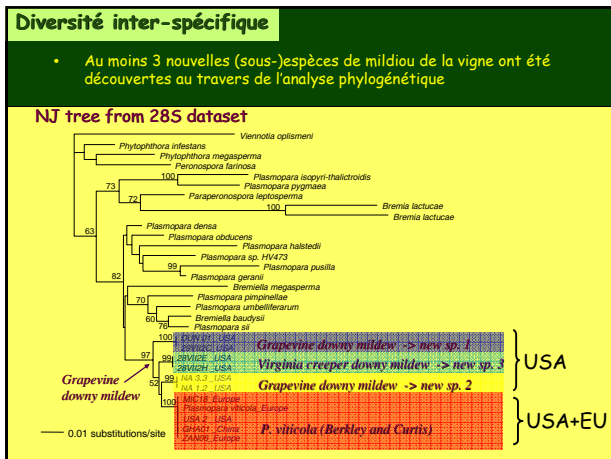
Caractérisation des allèles de résistance situés au cytochrome b, gène cible des fongicides de types strobilurines (QoI).

**Box 1.** Characterization of QoI resistance alleles in downy mildew populations has been done following 3 steps. Results are summarized in the table shown below and in Fig.1.

- 1) Testing *in vivo* sensitivity to famoxadone (QoI fungicide) on living isolates.
- 2) Sequencing entire cytochrome b from tested isolates, then identifying SNPs linked to QoI resistance.
- 3) Quantifying SNP-cyb143 by implementing the screening technique of SNP typing, CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences).

Isolate	CI50	CI90	Phenotype	Cyb 143
MIC 11	>1500	>1500	R	Ala
MOR 08	>1500	>1500	R	Ala
BOM 03	45	100	r	Gly
PKC 20	50	<100	r	Gly
COU 05	40	<100	r	Gly
LEO 04	<10	<10	s	Gly
PCN 04	<10	<10	s	Gly

CI50, CI90: fungicide concentration applied to inhibit 50% and 90% of fungus growth, respectively.





## **Structuration des populations de *Phytophthora infestans* par des variétés de pomme de terre présentant différents niveaux de résistance**

Josselin MONTARRY, Roselyne CORBIERE, Sophie LESUEUR, Isabelle GLAIS,  
Didier ANDRIVON

INRA, UMR BiO3P, Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex

Comprendre la sélection exercée par la plante hôte et ses conséquences sur la structure des populations pathogènes est essentiel à la gestion des maladies des plantes, que ce soit par la création variétale ou par l'identification des meilleures stratégies de déploiement de ces variétés dans le temps et l'espace. La réponse à la sélection exercée par les gènes majeurs, impliqués dans les résistances race spécifiques, a été démontrée pour de nombreux pathosystèmes dans le passé, y compris pour le mildiou de la pomme de terre. En revanche, peu d'éléments sont disponibles concernant la sélection exercée par une résistance quantitative, partielle, supposée race non-spécifique. Nous cherchons ici à savoir si les patrons adaptatifs des populations de *Phytophthora infestans* sont similaires pour ces deux types de résistance, et si ils sont reliés au polymorphisme génotypique déterminé avec des marqueurs moléculaires.

Pour ce faire, des isolats français de *Phytophthora infestans* ont été échantillonnés deux années consécutives (2001 et 2002) sur des variétés de pomme de terre présentant différents niveaux de résistance ( Bintje – variété sensible, Désirée – variété partiellement résistante et Naturella – variété à résistance spécifique conférée par le gène R2), et caractérisés biologiquement pour le type sexuel et le pouvoir pathogène (virulence et agressivité) et génétiquement en utilisant des marqueurs moléculaires (AFLP).

Les populations locales étudiées sont clairement structurées par l'hôte pour la virulence : seuls les isolats originaires de Naturella sont capables d'attaquer cette variété. Mais ces populations sont également structurées par l'hôte pour l'agressivité : les isolats originaires du cultivar sensible (Bintje) sont les plus agressifs tant sur Bintje que sur Désirée, sans adaptation différentielle entre ces deux génotypes. La diversité génotypique observée est faible, ce qui suggère que la collection est constituée de quelques lignées clonales proches, et que la reproduction sexuée ne joue pas de rôle dans ces populations (malgré la présence conjointe des deux types sexuels A1 et A2 sur la parcelle en 2002). Aucune corrélation n'a été détectée entre le pouvoir pathogène et le groupe AFLP des différents isolats.

Ces données indiquent que l'adaptation pour le pouvoir pathogène a lieu dans les populations de *Phytophthora infestans*, mais que les patrons adaptatifs dépendent du type de résistance considéré. Il est donc indispensable d'établir des stratégies de déploiement des variétés adaptées à ces patrons adaptatifs.

**Mots clés :** Adaptation à l'hôte, diversité, AFLP, virulence, agressivité, type sexuel, *Phytophthora infestans*, mildiou de la pomme de terre, gestion des résistances, durabilité

## Structuration des populations de *Phytophthora infestans* par des variétés de pomme de terre présentant différents niveaux de résistance

Josselin MONTARRY  
UMR BiO3P – INRA Rennes

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Présentation du pathosystème

- ★ La pomme de terre, *Solanum tuberosum*
  - 4<sup>ème</sup> production mondiale
  - plusieurs types de production :
    - \* consommation
    - \* féculerie
    - \* plant

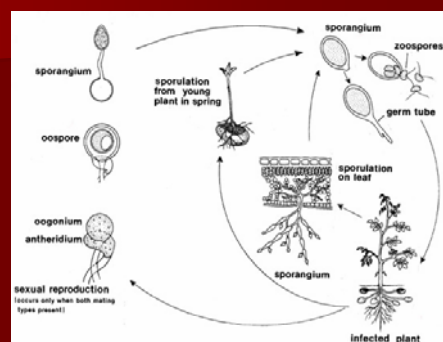
Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Présentation du pathosystème

- ★ La pomme de terre, *Solanum tuberosum*
- ★ L'agent pathogène : *Phytophthora infestans*
  - oomycète, famille des Pythiacées
  - hétérothallique - 2 types sexuels (A1 et A2)
  - cycle épidémique principalement aérien

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Cycle de *Phytophthora infestans*



D'après : <http://www.apsnet.org/education>

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Présentation du pathosystème

- ★ La pomme de terre, *Solanum tuberosum*
- ★ L'agent pathogène : *Phytophthora infestans*
- ★ La maladie : le mildiou
  - pertes de rendements allant jusqu'à 100%
  - peut toucher tous les organes de la plante

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Les symptômes

Sur feuilles :  
tâches brunes entourées d'un liseré clair à la face supérieure du limbe



Sur tige :  
nécroses brun-violacées



Sur bouquets terminaux :  
brunissent et se recroquevillent

Sur tubercule :  
tâches brun-violacées superficielles et irrégulières



Au champ :  
plantes noirâtres



Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Présentation du pathosystème

- ✦ La pomme de terre, *Solanum tuberosum*
- ✦ L'agent pathogène : *Phytophthora infestans*
- ✦ La maladie : le mildiou
- ✦ Différents moyens de lutte
  - prophylactique
  - chimique
  - génétique

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Objectif

Comprendre la sélection exercée par la plante hôte et ses conséquences sur la structure des populations pathogènes est essentiel à la gestion des maladies des plantes

- création variétale
- identification de stratégies de déploiement

Les patrons adaptatifs sont-ils similaires pour des populations de *Phytophthora infestans* issues de variétés présentant différents niveaux de résistance ?

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Echantillonnage

- dans une parcelle expérimentale à Ploudaniel (Finistère)
- en 2001 (66 isolats) et 2002 (73 isolats)



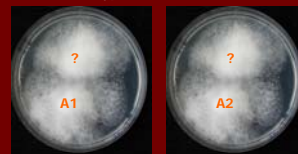
La caractérisation de ces isolats a porté sur :

- le type de compatibilité sexuelle
- le pouvoir pathogène : virulence et agressivité
- les empreintes génétiques

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Caractérisation sexuelle

Confrontation avec des souches de type sexuel connu



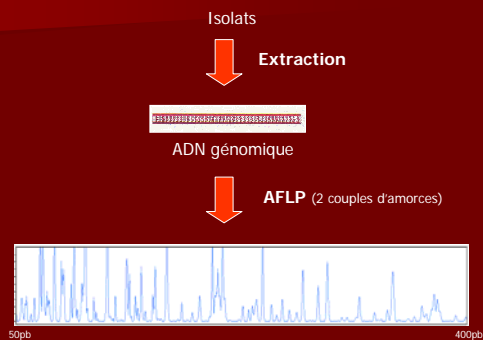
Détection des oospores par observation au microscope



100 % isolats A1 en 2001  
95 % isolats A1 en 2002 <-> 4 isolats A2

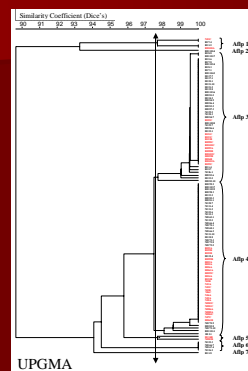
Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Caractérisation moléculaire



Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Caractérisation moléculaire



► Faible diversité génétique (> 90% de similarité)



La reproduction sexuée ne semble pas jouer de rôle dans cette population locale

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Tests de virulence

Gamme différentielle :  
génotypes avec gènes R1 à R11 + témoin sensible



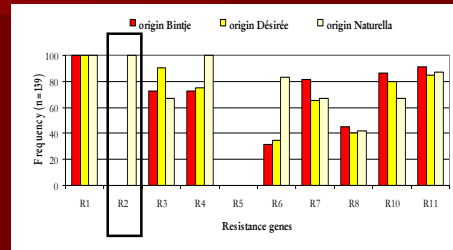
Inoculation :  
dépôt d'une suspension de sporanges



Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Structuration pour la virulence

Seuls les isolats originaires de Naturella contournent le gène R2



► Une variété avec un gène majeur de résistance structure la population pathogène pour la virulence

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Tests d'agressivité



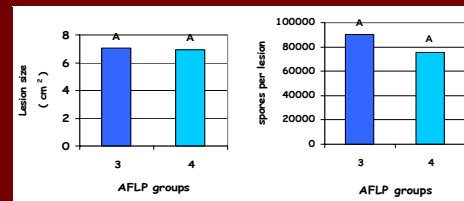
Composantes d'agressivité :

- Période de latence
- Efficacité d'infection
- Taille des lésions
- Production totale de spores
- Capacité de sporulation

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Structuration pour l'agressivité

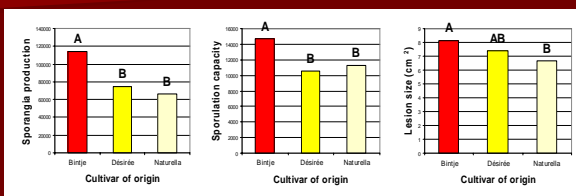
Tests statistiques sur les 2 principaux groupes AFLP (3 et 4)



► Aucune corrélation détectée entre le pouvoir pathogène et le groupe AFLP des isolats

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Structuration pour l'agressivité

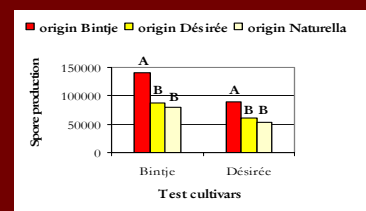


► Les isolats originaires de la variété sensible (Binje) sont les plus agressifs

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Structuration pour l'agressivité

Et ce tant sur Binje que sur Désirée, soit sans adaptation différentielle entre ces génotypes



► Une variété sans gène majeur de résistance structure la population pathogène pour l'agressivité

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand



## Conclusion

L'adaptation pour le pouvoir pathogène a lieu dans les populations de *Phytophthora infestans*, mais les patrons adaptatifs dépendent du type de résistance considéré

Il est indispensable d'établir des stratégies de déploiement des variétés prenant en compte ces patrons adaptatifs

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

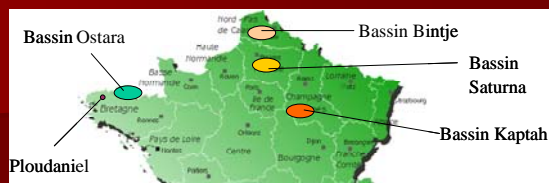
## Perspectives

- En France, où le déploiement en culture de la variété Bintje est bien plus important que celui de la variété Désirée, les souches les plus agressives proviennent de Bintje

- Au Maroc, où la variété Désirée est la plus déployée (par rapport à Bintje), les souches les plus agressives proviennent de Désirée

Ce constat nous a amené à formuler l'hypothèse d'une adaptation à la dominance de la variété plutôt qu'à la variété elle-même

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand



Déterminer si la pression de sélection, exercée depuis de nombreuses années par les variétés qui dominent les principaux bassins de production français, entraîne l'adaptation des populations de *P. infestans*

La culture prédominante d'une variété donnée amène-t-elle la sélection de souches du parasite plus particulièrement adaptées à cette variété ?

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Structuration des populations de *Phytophthora infestans* par des variétés de pomme de terre présentant différents niveaux de résistance

Josselin MONTARRY  
UMR BiO3P – INRA Rennes

Groupe oomycètes – 14/15 juin 2005 – Clermont-Ferrand

## Sélection du tournesol pour une résistance durable à ses principaux pathogènes.

Félicity Vear

UMR « ASP », Institut National de la Recherche Agronomique,  
234 avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand

Les maladies de tournesol pour lesquelles les publications sont, actuellement, les plus fréquentes sont la pourriture blanche due à *Sclerotinia sclerotiorum* (Ascomycète), le mildiou dû à *Plasmopara halstedii* (Oomycète), le phomopsis dû à *Diaporthe helianthi* (Ascomycète) auxquelles il faut rajouter les dégâts dus à *Orobanche cumana* (plante parasite). La sélection pour la résistance génétique a exploité, soit des gènes majeurs (mildiou, Orobanche), soit la résistance quantitative (*Sclerotinia*, phomopsis). Avec les gènes majeurs, les résistances ont été complètes mais non durables. Bien que de nouveaux gènes soient régulièrement trouvés, ils sont tous rapidement surmontés par les parasites. Pour la résistance quantitative, si les progrès ont été rapides dans le cas du phomopsis, ils sont lents pour *Sclerotinia*. Dans le cas de cette dernière, la recherche s'est orientée vers la possibilité d'exploiter la transformation génétique. Pour un contrôle efficace des maladies, un seul type de résistance n'est pas suffisant. Si la résistance monogénique est disponible, elle doit être combinée avec la résistance horizontale. En absence de résistance verticale, la sélection assistée par marqueur moléculaire devrait être mise en œuvre pour combiner différents QTL présentant différents mécanismes de résistance pouvant agir en synergie.

Vear, F., 2004. Breeding for durable resistance to the main diseases of sunflower. 16<sup>th</sup> International Sunflower Conférence. Fargo (ND, USA), August 29-September 2. 15-28

## SELECTION DU TOURNESOL POUR UNE RÉSISTANCE DURABLE A CES PRINCIPAUX PATHOGENES.

Félicity Vear  
INRA, UMR « ASP »  
Clermont-Ferrand, France.



Réunion du groupe Oomycètes, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

1



## Nombres de papiers traitant des maladies de tournesol présentées aux quatre dernières conférences internationales sur le tournesol

Année	1992 Pise	1996 Pékin	2000 Toulouse	2004 Fargo
<i>Sclerotinia</i>	12 (Fra 5, Ser 2, rhum 2)	12 (Fra 5, Chi 2, Etats-Unis 2)	15 (Fra 5, Etats-Unis 3, Arg 3)	9 (Fra 2, Ser 2)
Mildiou	4	12 (Fra 4, Chi 6)	10 (Fra 7)	5 (Fra 4)
Phomopsis	12 (Ser 4, Fra 4)	9 (Fra 4, Ser 3)	6 (Fra 4) (Fra 2)	2
Orobanche	3	4 (Chi 3)	5 (Fra 2)	3 (Esp 3)

Réunion du groupe Oomycètes, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

2



## Nombres de papiers sur d'autres les maladies de tournesol présentées aux quatre dernières conférences internationales

Année	1992 Pise	1996 Pékin	2000 Toulouse	2004 Fargo
<i>Macrophomina</i>	7 (Pak 2, Rom 2)	1	0	0
<i>Alternaria</i>	3 (Ser 2)	2	2	2 (Aus 2)
Rouille	1	5 (Aus 2)	1	1
<i>Phoma</i>	0	2	5 (Fra 5)	0
<i>Albugo</i>	0	4 (Afs 3)	1	0
<i>Fusarium</i>	0	0	0	2 (Bul 2)
<i>Verticillium</i>	0	1	1	1
<i>Botrytis</i>	1	1	0	0

Réunion du groupe Oomycètes, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

3

Complète, race-spécifique, vertical, gène majeur :

Mildiou, orobanche, rouille



Partielle, non-race-spécifique, horizontale, polygénique :

*Sclerotinia*, phomopsis, botrytis, alternaria.

Difficile à définir :

Verticillium : était monogénique, maintenant quantitatif !

Phoma : partielle, interaction génotype/isolat ?

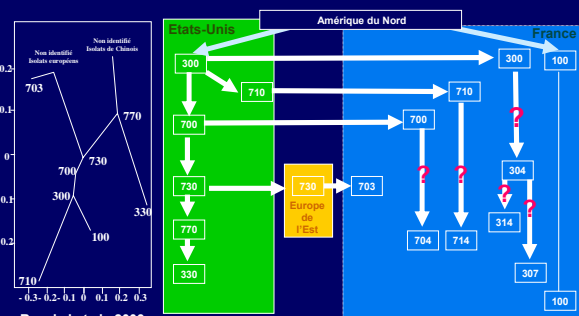
Albugo : partielle, interaction génotype/isolat ?



Réunion du groupe Oomycètes, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

4

## Analyse moléculaire des pathotypes (Tourville-2003)



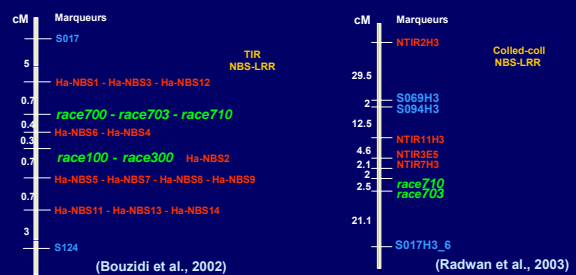
Réunion du groupe Oomycètes, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

5

## Cartographie des « clusters » de gènes PL

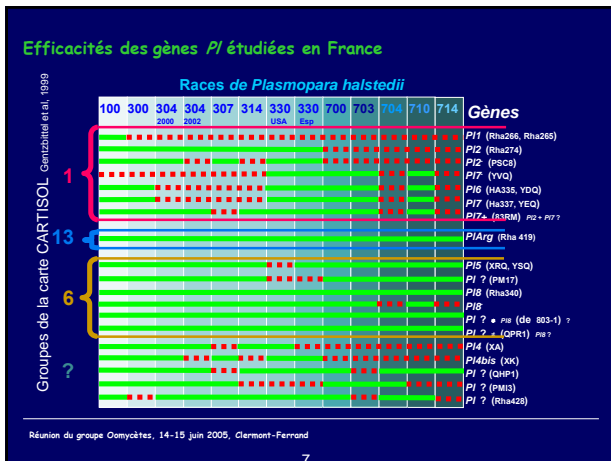
Cluster (P11, P12, P16, P17)  
sur le groupe 1

Cluster (P15, P18)  
sur le groupe 6



Réunion du groupe Oomycètes, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

6



### Gènes donnant la résistance aux races de *Orobanche cumana*

Races Origine

Race	Origine	Gènes de résistance efficace
A	Russie, Ukraine, 1935	Or1, Or2, Or3, Or4, Or5
B	Russie, Ukraine, 1935	Or2, Or3, Or4, Or5
C	Russie, Ukraine, 1980	Or3, Or4, Or5
D	Roumanie, 1980	Or4, Or5
E	Roumanie, Espagne,	Or5
F	Espagne 1996	2 gènes (Perez-Vich et al., 2004)

Lu et al., 1999 ; Gagne 2000 : Or1, Or4, Or5 : sur le groupe 16 de la carte de liaison CARTISOL (Gentzittel et al, 1999)

Réunion du groupe Oomyctes, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

### Sélection pour la résistance au mildiou en France depuis 1970

1965-1988 : Race 100 : résistance : *PI1, PI2*  
hybrides : sensible x *PI1*  
sensible x *PI2* nouveau ou back cross sur sensible

1988-2000 : Race 710, 703 : résistance : *PI5, PI6, PI7, PI8*  
hybrides : 1990 : *PI6/PI7* x *PI1/PI2*  
1996 : *PI5* x *PI2* nouveau

2000-2002 : Race 304, 314 : résistance *PI2, PI5, PI8*  
hybrides : *PI6/PI7* x *PI2*  
*PI6/PI7* x *PI1 + PI5* back cross

2003-2004 : Race 307, 704, 714 : résistance *PI5, PI8*  
Race 334 : résistance *PI8*  
hybrides : *PI6/PI7* x *PI2 + PI5 / PI8* nouveau ou back cross sur sensible

Réunion du groupe Oomyctes, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

### Pourcentage d'attaque sur 16 lignes de tournesol infectées avec des spores de 10 isolats de *Sclerotinia sclerotiorum* (Vear et al. 2004)

Lignées	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1 CP73	38.3	85.6	66.6	90.0	38.4	61.6	58.0	56.0	80.4	61.1	63.6
2 F-N	6.2	8.5	9.6	4.0	6.5	4.0	12.0	4.0	7.8	14.6	7.7
3 FU	15.3	49.6	23.7	28.4	28.0	29.9	24.0	22.0	10.7	26.8	25.8
4 GB	84.2	94.2	90.1	91.8	87.3	98.0	90.5	90.3	87.6	100.0	92.4
5 GH	33.3	80.0	48.6	64.4	29.9	67.3	36.9	34.5	55.1	26.1	47.6
6 GU	70.5	91.7	92.3	90.1	92.2	84.0	94.0	82.9	94.2	93.2	89.5
7 SD	36.7	66.3	57.8	70.8	34.0	56.9	48.0	36.9	51.4	36.7	51.6
8 VHQ	0.0	15.6	3.8	14.5	9.9	12.3	8.4	4.2	7.8	16.7	9.3
9 VLQ	0.0	4.0	1.9	5.8	4.2	2.1	2.0	2.0	4.0	8.0	3.4
10 PAC1	4.0	34.9	15.8	27.6	10.0	16.0	13.7	7.6	12.0	1.9	14.4
11 PAZ2	18.9	43.2	27.0	25.4	21.4	36.3	16.3	17.9	42.7	35.1	28.4
12 PRS6	43.1	82.4	54.9	69.0	80.9	37.5	51.8	45.2	65.6	50.4	56.1
13 PSCB	0.0	0.0	5.9	7.8	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	6.0	2.0
14 PST5	4.0	11.8	0.0	9.6	2.1	4.0	3.9	0.0	2.0	2.2	4.0
15 PSU7	2.0	18.0	7.9	16.7	11.9	19.3	13.6	0.0	5.9	1.9	9.7
16 PSS2	11.9	14.1	3.8	6.3	5.9	7.9	10.0	2.0	11.9	3.9	7.8
moyenne	23.0	45.0	31.7	38.9	27.7	33.6	30.2	25.5	33.8	30.3	32.0

Réunion du groupe Oomyctes, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

### QTL pour la résistance aux attaques de *S. sclerotiorum* mesurée par test « ascospores » (Bert et al, 2004)

6 populations F3

Pour chaque croisement : 6 ou 7 QTL solides  
14 des 17 groupes de liaison sont concernés

% d'attaque : 10 groupes      indice de latence : 9 groupes

9-63% de la variation phénotypique expliquée

Seulement % R<sup>2</sup> élevés pour les essais multilocal : avec PAC1 sur le groupe 1 lié à une Protéine-Kinase

Réunion du groupe Oomyctes, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

### QTL pour la résistance au *Sclerotinia* sur capitule mesurée par le test « ascospore »

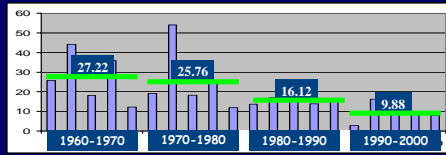
Linkage group	1	2	4	5	6	7
Cross	OT1 x SD	OT1 x SD	OT1 x SD	OT1 x SD	OT1 x SD	OT1 x SD
Test = 1.1	OT1	SD	OT1	SD	OT1	SD
% of Phenotypic variation	59	43	11	13	20	14

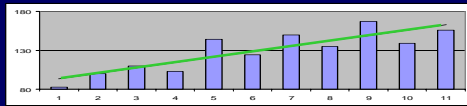
Linkage group	8	9	10	13	14	15	16	17
Cross	OT1 x SD	OT1 x SD	OT1 x SD	OT1 x SD	OT1 x SD	OT1 x SD	OT1 x SD	OT1 x SD
Test = 1.3	OT1	SD	OT1	SD	OT1	SD	OT1	SD
% of Phenotypic variation	9	11	15	13	11	12	58	9

Réunion du groupe Oomyctes, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

### Attaques moyennes sur capitule de variétés inscrites de 1960 à 2000



Moyennes de l'indice de latence d'un pool sous sélection récurrente observées sur 11 cycles de tests « ascospores »



Gain par cycle = 7.75% = 2.06 jours

Réunion du groupe Oomyctés, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

13

### Perspective pour la recherche et la sélection pour la résistance

Objectifs : un niveau élevé de résistance  
une résistance durable



#### Recherche :

\*\*\* (Nouvelles sources de résistance)

\*\*\* Gènes majeurs de résistance :

structure des gènes, ex: NBS-LRR-CC, TIR-NBS-LRR, Protéine-Kinase à terme : peut-être que certaines structures donnent une résistance plus durable que d'autres

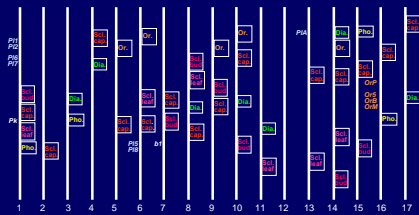
\*\*\* Résistance quantitative :

nombre et fréquences de QTL, leur importance  
cartographier : pour déterminer la recombinaison possible à terme : l'identification des gènes, structure, allèles, ...

Réunion du groupe Oomyctés, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

14

### Carte simplifiée des groupes de liaison Gentzbittel et al. (1999) avec les gènes de résistance (à gauche) et les QTL (à droite)



Gènes : Or= résistance aux races d'Orabanche (P= Pipa blanca-Spain; B= Bulgarian; M= Mencia-Spain)  
PI= ramification  
Pk= protéine kinase

QTL : Sc= *Sclerotinia sclerotiarum* (cap= capitule; bud= bouton terminal; leaf= feuille)  
Plo= *Plasma macdonaldii*  
Dia= *Diaporthe helianthi* (phomopsis)  
Or= *Orabanche cumana*

Réunion du groupe Oomyctés, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

15

### Sélection pour des résistances verticales



\*\*\* Besoin d'améliorer la longévité

--- combinaisons de gènes majeurs

--- utilisation de la résistance partielle

--- combinaison avec la lutte chimique

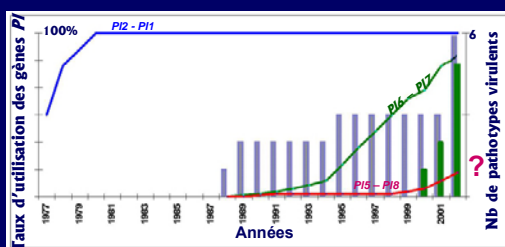
exemple : mildiou/métalaxyl :  
1990-2000 : gènes efficaces au traitement des semences  
les deux ont été surmontés par le parasite

exemple : orobanche/imidazoles  
besoin de combiner les gènes majeurs de résistance au parasite et à l'herbicide  
et probablement aussi avec certains gènes de résistance non spécifique

Réunion du groupe Oomyctés, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

16

### Comparaison du taux d'utilisation des gènes PI et le nombre de pathotypes virulents



(Tourvieille et al., 2004)

Réunion du groupe Oomyctés, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

17

### Sélection pour des résistances verticales



\*\*\* Besoin d'améliorer la longévité

--- combinaisons de gènes majeurs

--- utilisation de la résistance partielle

--- combinaison avec la lutte chimique

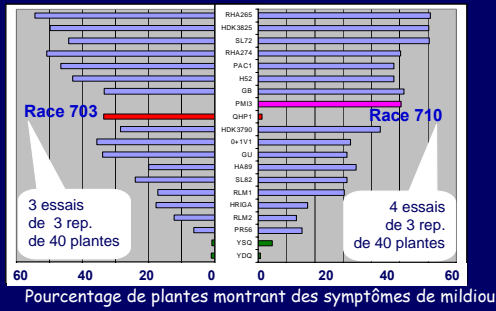
exemple : mildiou/métalaxyl :  
1990-2000 : gènes efficaces au traitement des semences  
les deux ont été surmontés par le parasite

exemple : orobanche/imidazoles  
besoin de combiner les gènes majeurs de résistance au parasite et à l'herbicide  
et probablement aussi avec certains gènes de résistance non spécifique

Réunion du groupe Oomyctés, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

18

Pourcentage d'attaque de Mildiou observés en infection naturelle avec deux races : 703 ou 710



Réunion du groupe Oomyctères, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

19

Sélection pour des résistances verticales



\*\*\* Besoin d'améliorer la longévité

--- combinaisons de gènes majeurs

--- utilisation de la résistance partielle

--- combinaison avec la lutte chimique

exemple : mildiou/métalaxyl :

1990-2000 : gènes efficaces ou traitement des semences  
les deux ont été surmontés par le parasite

exemple : orobanche/imidazoles

besoin de combiner les gènes majeurs de résistance au parasite  
et à l'herbicide

et probablement aussi avec certains gènes de résistance  
non spécifique

Réunion du groupe Oomyctères, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

20

Combinaison de gènes majeurs et de résistances quantitatives



Plusieurs possibilités :

1. Si de bons marqueurs de la résistance quantitative sont disponibles :  
Sélection pour des gènes *P1* comme d'habitude (plantes sélectionnées par des tests sur plantules ou avec des marqueurs moléculaires)

Inclure la résistance quantitative avec l'utilisation obligatoire des marqueurs moléculaires car la résistance phénotypique est masquée par les gènes majeurs

2. À court terme ou si les marqueurs moléculaires ne sont pas disponibles :

Sélection pour la résistance quantitative avec des essais au champ :  
Plantes F2 : maintenir ceux sans symptômes (mais elles peuvent être des « échappées »)

Descendance F3, F4... : examiner sur un échantillon,

Puis réaliser des back cross pour introduire les gènes majeurs

Réunion du groupe Oomyctères, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

21

Conclusions :

Un seul type ou source de résistance n'est jamais suffisant.



Pour obtenir un niveau élevé de résistance durable,

Une résistance non race-spécifique est nécessaires,  
bien qu'elle soit habituellement partielle

Si la résistance verticale est disponible,

\*\*\* Combiner avec la résistance horizontale

\*\*\* Combiner avec la résistance à un herbicide pour l'Orobanche

Si la résistance verticale n'est pas disponible,

\*\*\* Combiner plusieurs sources de résistance partielle,

\*\*\* Utiliser la transformation génétique qui peut apporter une solution, mais seulement combinée avec la résistance horizontale.

Réunion du groupe Oomyctères, 14-15 juin 2005, Clermont-Ferrand

22

## **Cartographie génétique comparée et clonage de gènes et QTL de résistance à *Plasmopara viticola* et à *Uncinula necator* chez la vigne.**

Gisèle Butterlin, Pascale Coste, Vincent Dumas, Didier Merdinoglu, Emilce Prado, Sylvain Schnee, Sabine Wiedemann-Merdinoglu

*INRA, UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin  
28, rue de Herrlisheim, BP 507 – 68021 Colmar*

La disponibilité de nombreuses sources de résistance à *P. viticola* dans les espèces du genre *Vitis* (telles *V. riparia* et *V. amurensis*) et dans l'espèce *M. rotundifolia* permet d'envisager la construction de nouvelles variétés par une stratégie de pyramidage de gènes ou de QTL afin d'améliorer l'efficacité et la durabilité de la résistance. Cependant, la connaissance du déterminisme génétique des résistances naturelles chez la vigne est un prérequis pour la création variétale.

*M. rotundifolia* est une espèce d'origine nord-américaine possédant une résistance totale au mildiou mais aussi à l'oïdium de la vigne (*Uncinula necator*). Les premiers résultats obtenus au laboratoire sur cette source à l'aide d'une population BC2 ont permis d'identifier un QTL expliquant 74 % de la variation phénotypique observée. Ce résultat suggère fortement que ce QTL est un gène majeur que nous avons nommé *Rpv1* (Merdinoglu *et al* 2003). Par ailleurs, nous avons montré que *Rpv1* se trouvait dans la même région chromosomique que le gène de résistance à l'oïdium, Run1, précédemment décrit et cartographié (Bouquet 1986, Pauquet *et al* 2001).

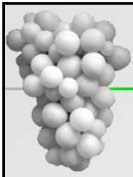
Cependant, les niveaux de résistance observés chez *M. rotundifolia* ou d'autres individus issus de croisements *Muscadinia rotundifolia* x *Vitis vinifera* étant supérieurs à ceux observés sur la population BC2 ayant servi à identifier *Rpv1*, il est très vraisemblable que *M. rotundifolia* renferme d'autres facteurs de résistance complémentaires à *Rpv1*. Plus récemment, un nouveau gène inhibant le développement de *P. viticola* et appelé *Rpv2* a été mis en évidence, ceci à l'aide d'une nouvelle population BC1 obtenue à partir d'un hybride *M. rotundifolia* x *V. vinifera* présentant un niveau de résistance supérieur au parent résistant du BC2 étudié auparavant.

D'autre part, l'étude de la descendance d'un hybride entre le clone Riparia Gloire originaire aussi d'Amérique du nord, et Cabernet Sauvignon nous a permis de mettre en évidence trois autres QTL expliquant, chacun, entre 10 et 22% de la variabilité observée pour la résistance au mildiou et à l'oïdium

La localisation des gènes ou des QTL et leur caractérisation moléculaire à partir de l diverses sources de résistances disponibles sont des éléments importants, tant pour accélérer la sélection que pour choisir les combinaisons les plus complémentaires dans une stratégie de pyramidage visant à associer divers gènes de résistance.

### Références bibliographiques

- Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Coste P., Dumas V., Haetty S., Butterlin G., Greif C., Adam-Blondon A-F., Bouquet A., Pauquet J. (2003) Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. Acta Horticulturae 603: 451-456.
- Bouquet A. (1986). Introduction dans l'espèce *Vitis vinifera* d'un caractère de résistance à l'oïdium (*Uncinula necator*) issu de l'espèce *Muscadinia rotundifolia*. Vignevivi 12 (supp) : 141-146- Pauquet J, Bouquet A, This P, Adam-Blondon AF (2001) 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. Theor Appl Genet 103: 1201–1210



## Cartographie génétique comparée de QTL de résistance à *Plasmopara viticola* et à *Ucinula necator* chez la vigne

Bilan 2004 - Perspectives 2005



## Bases génétiques de la résistance au mildiou et à l'oïdium

Une finalité majeure ...

Construire des variétés possédant une résistance durable

- combinant plusieurs sources de résistance
- ayant de bonnes aptitudes culturales et oenologiques
- adaptées aux trois grands ensembles viticoles français

... deux approches complémentaires

Inventaire et caractérisation des sources de résistance

- Identification et caractérisation des gènes de résistance

Diversité et potentiel évolutif des pathogènes

- Durabilité des gènes de résistance



## Le mildiou de la vigne

L'agent responsable :

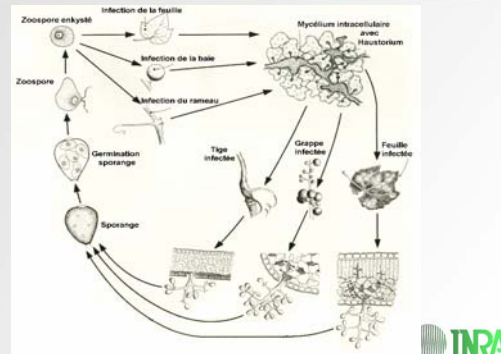
- *Plasmopara viticola*
- Oomycète, ordre des Péronosporales

Sa biologie :

- Parasite obligatoire de la vigne
- Phase sexuée : conservation (hiver) et foyer primaire (printemps)
- Phase asexuée : contamination des organes herbacés et développement épidémique



## Cycle infectieux du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*)



## Evaluation du niveau de résistance au mildiou

Elevage des plantes → Inoculation



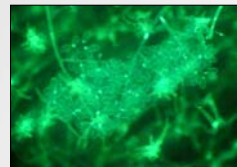
## Evaluation du niveau de résistance au mildiou

Elevage des plantes → Inoculation → Mesure de la résistance

Echelle de notation visuelle semi-quantitative



Quantité de sporanges émis par unité de surface foliaire

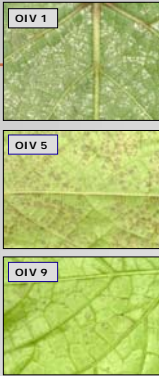





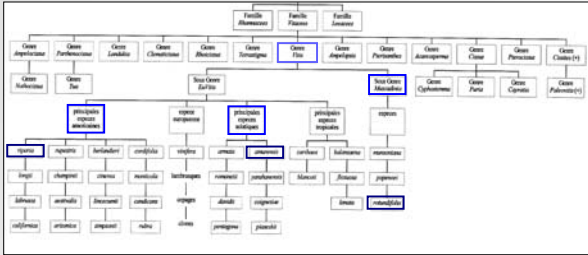
## Evaluation de la résistance au mildiou

**Echelle de notation OIV 452**



Notation	Degré de résistance	Fructifications	Points de tapiserie	Taches nécrotiques
1	très faible	abondantes généralisées	généralisés	absentes
3	faible	abondantes	nombreux	absentes
5	moyen	variables	irréguliers	absentes
7	élevé	rare	rare	réduites
9	très élevé	absentes	absents	variables

## Sources de résistance au mildiou chez les Vitacées





(D'après J.-M. Boursiquot)

## Muscadina rotundifolia

- résistance totale au mildiou (*Plasmopara viticola*)
- résistance à l'oïdium (*Uncinula necator*)
- résistance au nématode *Xiphinema index*
- populations d'étude disponibles

- 2n = 40 chromosomes
- peu interfertile avec *Vitis vinifera*
- défauts organoleptiques majeurs

## Population RV2 : 40525



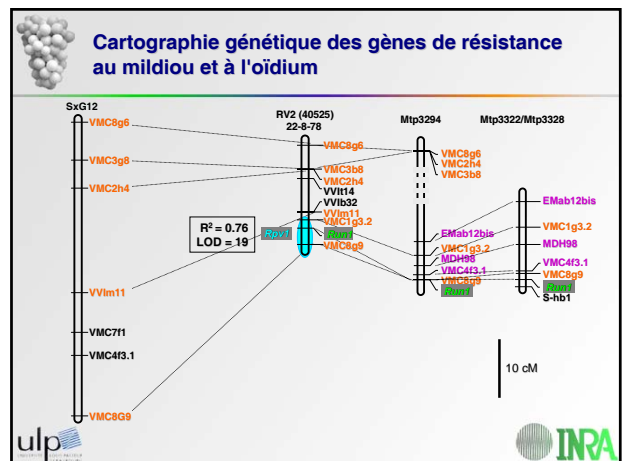
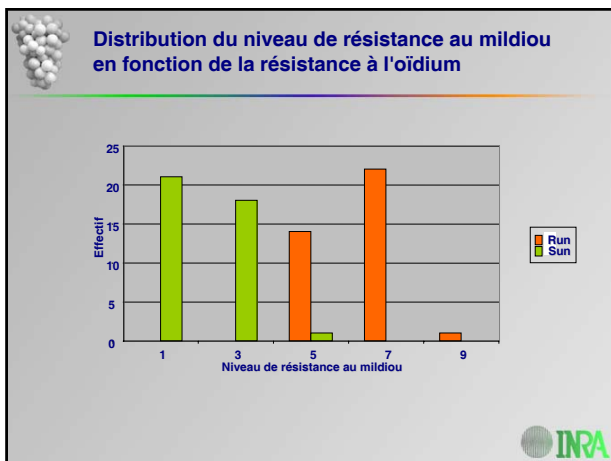
[cabernet sauvignon x alicante bouschet] x *Muscadina rotundifolia* var. Dearing

F1 : 8778 x [mourvèdre x cabernet sauvignon x pinot meunier]

RV1 : 22-8-78 x syrah (OIV : 7)

RV2 : 40525 (83 plantes) (OIV : 3)

- Résistance au mildiou :**
  - inoculation artificielle sur plantes entières
  - évaluation visuelle semi-quantitative (OIV452) et comptage de sporanges
- Résistance à l'oïdium**
  - inoculation artificielle sur disques foliaires
  - évaluation visuelle de la présence de conidies
- Identification de marqueurs moléculaires associés à la résistance**
  - recherche parmi 151 RAPD, 13 ISSR et 208 SSR par BSA et cartographie

## Résistances dérivées de *M. rotundifolia*

- QTLs de résistance mineurs présents dans 22-8-78 mais non détectés dans la population 40525 ?  
Nouvelle population avec effectif plus important : 41524
- QTLs / gènes de résistance absents chez 22-8-78 mais présents chez la muscadine ?

22-8-78  
OIV : 7

8106  
OIV : 9

8624  
OIV : 9

↓

41529

↓

41528

## Population RV2 : 41524

[cabernet sauvignon x alicante bouschet] x *Muscadinia rotundifolia* var. Dearing

F1 : 8778 x [mourvèdre x cabernet sauvignon x pinot meunier]

RV1 : 22-8-78 x syrah

OIV : 7

RV2 : 41524

OIV : 3

333 plantes

- Résistance au mildiou :**
  - inoculation artificielle sur disques foliaires
  - notation visuelle semi-quantitative (notation OIV452), concentration de sporanges
- Résistance à l'oïdium**
  - inoculation naturelle en serre sur plante entière
  - évaluation visuelle de symptômes
- Identification de marqueurs moléculaires associés à la résistance**
  - cartographie de 54 SSR

## Population RV1 : 41528

*Muscadinia rotundifolia* var. Trayshed x [carignan x cabernet sauvignon]

F1 : 8624 x cabernet sauvignon

OIV : 9

RV1 : 41528

OIV : 3

129 plantes

- Résistance au mildiou :**
  - inoculation artificielle sur disques foliaires
  - notation visuelle semi-quantitative (OIV452, nécroses, sporulation), concentration et taille des sporanges
- Résistance à l'oïdium (en cours)**
  - inoculation naturelle en serre sur plante entière
  - évaluation visuelle de symptômes
- Identification de marqueurs moléculaires associés à la résistance**
  - cartographie de 65 SSR

## QTL de résistance au mildiou (RV1 : 41528)

Rpv2

Rpv1

Legend:

- OIV452
- Présence de sporulation
- Intensité de sporulation
- Nécrose stomatique
- Nombre de sporanges
- Taille des sporanges

## Développement de l'infection

Rpv2

Rpv1

Labels: zoospore, filament germinatif, vésicule d'infection, haustorium

Stade: hyphe primaire (Hpi 2), hyphe long (24), hyphe branché (48), mycélium (72), sporulation (96)

## Population *Riparia* Gloire x cabernet sauvignon

*Riparia* Gloire de Montpellier x cabernet sauvignon

F1 : RGM x CS  
138 plantes

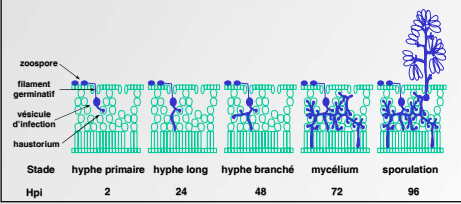
- Résistance au mildiou :**
  - inoculation artificielle sur disque foliaires
  - notation visuelle semi-quantitative (OIV 452), concentration de sporanges
- Résistance à l'oïdium**
  - inoculation naturelle en serre sur plante entière
  - évaluation visuelle de symptômes
- Identification de marqueurs moléculaires associés à la résistance**
  - cartographie de 167 SSR

### QTL de résistance au mildiou : bilan

Nom	Populations	Origine
Rpv1	40524-41524-41528	<i>M. rotundifolia</i>
Rpv2	41528	<i>M. rotundifolia</i>
Mu4	41524ΔRpv1	<i>M. rotundifolia</i>
Sy3	41524ΔRpv1	Syrah
Rg9	RGM x CS	<i>Riparia</i> GM
Rg11	RGM x CS	<i>Riparia</i> GM
Rg14	RGM x CS	<i>Riparia</i> GM
Cs12	RGM x CS	Cabernet sauv.

ulp INRA

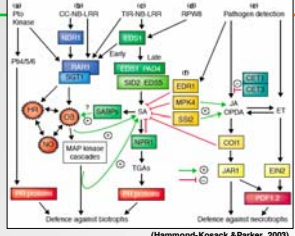
### Perspectives : analyse Rpv1 et Rpv2



- Caractérisation des résistances
  - Analyse cytologique des stades de l'infection de *Plasmopara viticola*

ulp INRA

### Perspectives : analyse Rpv1 et Rpv2

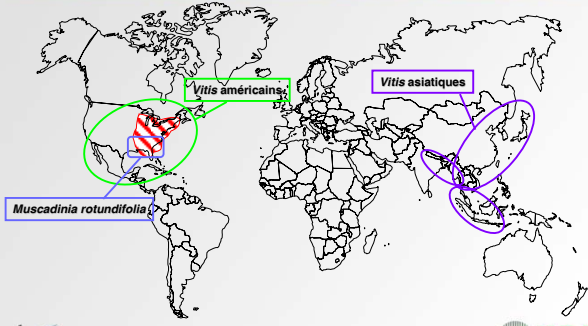


- Caractérisation des résistances
  - Analyse cytologique des stades de l'infection de *Plasmopara viticola*
  - Réaction d'hypersensibilité et réponses précoces à l'infection
  - Etude des gènes clés exprimés au cours de l'interaction

(Hammond-Kosack & Parker, 2003)

ulp INRA

### Perspectives : analyse de nouvelles sources de résistance au mildiou chez les Vitacées



UMR1131 - Equipe GAP

ulp INRA

### Autres perspectives 2005 - 2006

- Rechercher de nouveaux recombinants dans la région Rpv1-Run1
  - Analyser les autofécondations de muscadines
- Confirmer les QTL mineurs issus de *M. rotundifolia* et *V. riparia*
  - Compléter les cartes dans les régions identifiées
  - Augmenter les effectifs des populations
- Saturer la carte de la région Rpv2
- Cartographier des gènes candidats
- Rechercher des QTL de résistance de source *V. amurensis*

ulp INRA

### Contributeurs

UMR VVA - Colmar Sabine WIEDEMANN-MERDINOGLU Pascale COSTE Vincent DUMAS Gisèle BUTTERLIN Emilce PRADO Didier MERDINOGLU	UMR BEPC, Montpellier Alain BOUQUET  UMR DGPC, Montpellier Jean-Pierre PEROS
UREFV, Bordeaux Stéphane DECROOCCQ	

ulp INRA

**Projet de plateforme de phénotypage pour l'étude de la résistance de la vigne à *Plasmopara viticola* et à *Uncinula necator***

Sabine Merdinoglu, Vincent Dumas, Pascale Coste et Didier Merdinoglu

UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin. INRA-ULP.  
68021 COLMAR Cedex

Dans le cadre de notre programme de recherche de gènes de résistance au mildiou et à l'oïdium, nous sommes en train de concevoir une plateforme de phénotypage. Cette plateforme sera principalement dédiée aux programmes de génétique (cartographie), de génomique et de sélection et sera ouverte à d'autres programmes. Par rapport aux moyens existant actuellement, ses principaux objectifs sont d'augmenter le débit des bio-essais réalisés, d'homogénéiser et de standardiser les conditions de test afin de limiter le nombre de répétition par génotype testé et d'accroître la précision des évaluations quantitatives. Nous présenterons les objectifs fixés pour la plateforme ainsi que la démarche que nous avons suivie pour aboutir à ce projet.

## Projet de plateforme de phénotypage à haut débit pour l'étude de la résistance de la vigne au mildiou et à l'oidium

Sabine Merdinoglu, Vincent Dumas, Pascale Coste et Didier Merdinoglu

### Objectifs de la plateforme

#### Cartographie génétique

Analyse de 800 couples « plante X souche » par an

#### Cartographie fine

4000 plantes par an

#### Sélection

5000 pépins par an

#### Inventaire de sources de résistance

### Phénotypage

#### 1. Disposition d'un set de souches monosporiques

#### 2. Phénotypage sur disques foliaires

- ° Pré-conditionnement des plantes en conditions contrôlées avant phénotypage
- ° Prélèvement de feuilles identifiées par leur rang sur une plante d'âge défini
- ° Automatisation de la découpe des disques
- ° Automatisation de l'inoculation
- ° Incubation en conditions contrôlées
- ° Automatisation de la lecture du paramètre quantitatif de résistance « quantité de spores émises par unité de surface foliaire »
- ° Rythme de 200 plantes par semaine
- ° Reproductibilité des résultats

#### 3. Limitation du nombre de répétitions

#### 4. Disposition d'un set de plantes témoins de niveaux de résistance variable

### Cartographie génétique

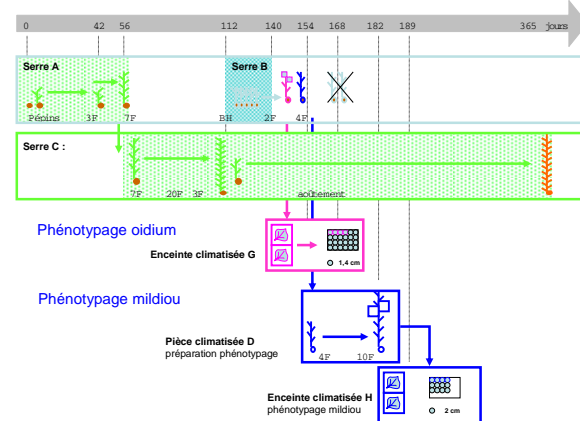
**Objectifs :** cartographie de gènes, de QTLs majeurs et de QTLs mineurs à haut débit

**Comment :** - augmenter le débit de plantes testées

- augmenter la reproductibilité des résultats de phénotypage

- rythme de 200 plantes par semaine

### Cartographie génétique. Calendrier du phénotypage d'une série de 200 plantes



### Cartographie fine

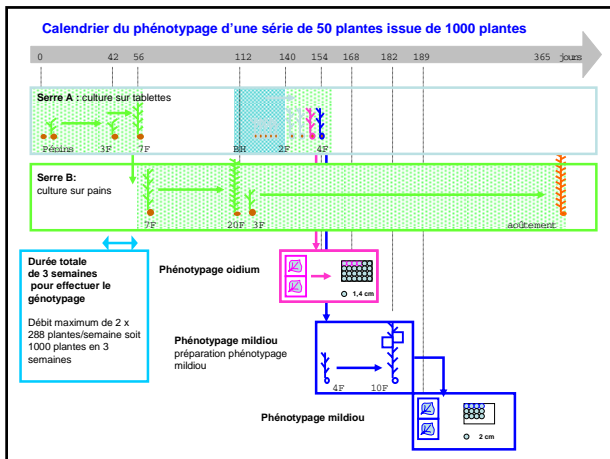
#### Objectifs :

saturer des régions bien précises du génome voisines de gènes/QTL identifiées

#### Cahier des charges :

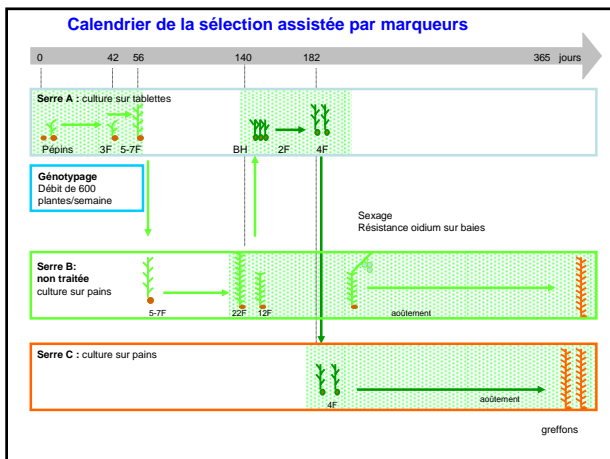
sur une base de 4000 plantes par an et avec un taux de 5% de recombinants, soit phénotypage de 200 génotypes par an.

- 1) génotyper rapidement les plantes pour sélectionner les recombinants
- 2) effectuer le phénotypage mildiou et oidium sur les recombinants
- 3) rythme : 4 séries de 1000 plantes avec 50 génotypes à phénotyper



### La sélection assistée par marqueurs

- **Objectif** : - traiter des populations d'effectif d'environ 5000 pépins par an  
- la sélection assistée par marqueurs à l'aide d'un génotypage l'année n  
- la multiplication des génotypes l'année n
- **Comment** : - avoir des marqueurs proches des gènes d'intérêt  
- débiter les semis en décembre  
- identifier le sexe sur le pied mère l'année n  
- obtenir des greffons du pied mère et des boutures l'année n  
- greffer les greffons l'année n+1 pour les implanter sur 4 sites



### Cahier des charges

1. Homogénéiser et standardiser les conditions de phénotypage
2. Réduire le nombre de répétitions
3. Entretenir une collection de souches
4. Tester la résistance vis à vis de plusieurs souches
5. Automatiser certaines mesures et actions
6. Conserver les génotypes

### Premières estimations

Type de local	Surfaces
Serre A	80m <sup>2</sup>
Serre B	3X5m <sup>2</sup>
Serre C	160m <sup>2</sup>
P. clim D	2X8m <sup>2</sup>
E. clim E	4X3m <sup>2</sup>
E. clim F et G	

#### Automates

Disques foliaires  
Chambre d'inoculation mildiou  
Chambre d'inoculation oidium  
Coulter Beckman

**Activités de recherche relatives aux pathosystèmes Solanacées / *Phytophthora* à l'UGAFL de Montfavet-Avignon**  
Véronique Lefebvre

INRA-GAFL  
BP94-84143 Montfavet cedex

- Cartographie de QTL de résistance chez le piment, la tomate, l'aubergine (programmes internes GAFL) et la pomme de terre (en collaboration avec APBV Ploudaniel)
- Rétro-croisements assistés par marqueurs pour transférer la résistance polygénique à *P. capsici* chez des variétés de piment élités
- Caractérisation d'un QTL de résistance à *P. capsici* chez le piment (effet majeur, conservé au niveau intraspécifique, colinéaire à des QTL de résistance à *P. infestans* chez tomate et pomme de terre) → cartographie fine + haute résolution + physique en vue de son clonage
- Identification des gènes régulés en condition d'infection par *P. capsici* chez un géniteur piment résistant par cDNA-AFLP, cartographie génétique chez le piment et cartographie physique chez la pomme de terre, étude fine d'expression
- Etablissement d'un inventaire des locus et des allèles de résistance aux *Phytophthora* chez les Solanacées (à initier dans le cadre d'un projet européen intégré 2005-2010)
- Effet des QTL par l'étude de la symptomatologie en condition d'infection par *P. capsici* chez le piment: comparaison de géotypes sensibles et résistants (différentes combinaisons de QTL)

**La résistance liée à l'âge des plantes vis-à-vis de *Phytophthora* :  
caractérisation d'une forme de mort cellulaire activée chez *P. parasitica*  
lors de l'interaction avec *Nicotiana tabacum***

Eric Galiana

UMR INRA / Univ. Nice-Sophia Antipolis / CNRS : Interactions Plantes  
Microorganismes et Santé Végétale INRA 400 route des Chappes - BP 16706903  
SOPHIA ANTIPOLIS CEDEX

L'expression d'une résistance vis-à-vis des infections pathogènes en relation avec le développement de l'hôte a été rapportée chez de nombreuses plantes à travers le règne végétal. Ce phénomène est appelé la résistance liée à l'âge (ARR) ou encore la résistance ontogénique. Chez *Nicotiana tabacum*, l'expression de cette résistance requiert des modifications extracellulaires qui perturbent grandement deux étapes importantes du cycle de *Phytophthora parasitica*: la survie des zoospores et des cystes non germées, la capacité des cystes germés à coloniser les tissus de l'hôte. Nous cherchons à décrire la mort cellulaire chez *Phytophthora parasitica* induite en réponse à des stimuli sécrétés par la plante au cours de l'ARR. D'un point de vue morphologique et ultrastructurale, la mort cellulaire induite chez des zoospores se caractérise par des réarrangements membranaires dynamiques, une diminution du volume cellulaire, l'apparition de grandes vacuoles et la dégradation des constituants cytoplasmiques avant rupture de la membrane plasmique. Certaines de ces caractéristiques sont inhibées par la cycloheximide. D'un point de vue biochimique, elle est associée à l'accumulation intracellulaire d'espèces actives de l'oxygène, ce qui suggère qu'une bouffée oxydante accompagne le processus cellulaire. Elle ne semble pas impliquer d'activité protéasique apparentée à celle des caspases. Nos résultats nous conduisent à proposer l'existence, chez *P. parasitica*, d'un phénomène de mort cellulaire programmée (MCP) de type vacuolaire régulé lors de l'interaction et activé au cours de l'ARR. Plusieurs implications dérivent de cette observation. La première est que la régulation de la MCP d'un agent phytopathogène est, tout comme la régulation de la MCP de la plante hôte, un événement capital pour le devenir des interactions plantes-pathogènes. La seconde est que la capacité d'autodestruction est un élément de contrôle du cycle infectieux qui pourrait par ailleurs participer à la faculté des micro-organismes à s'adapter aux plantes qu'ils colonisent.





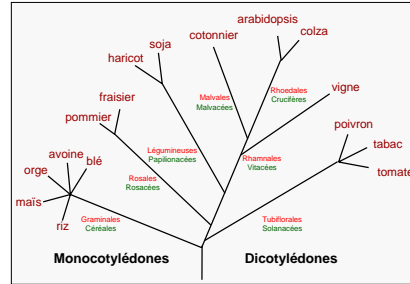
## La résistance liée à l'âge des plantes



Caractérisation de la mort cellulaire activée chez *P. parasitica* lors de l'interaction avec *N. tabacum*

## La résistance liée à l'âge à travers le règne végétal

### Un spectre large



#### Virus

- VMV
- CMV
- tobamovirus

#### Bactérie

- Pseudomonas
- Xanthomonas

#### Oomycète

- Peronospora
- Phytophthora

#### Champignon

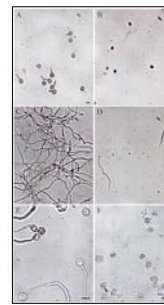
- Blumeria
- Cladosporium
- Colletotrichum
- Leptosphaeria
- Magnaporthe
- Puccinia
- Pyrenophora
- Rhizoctonia
- Verticillium

## La résistance liée à l'âge

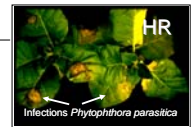


- ❖ Une connaissance minutieuse du potentiel de défense de la plante en relation avec son développement
- ❖ La caractérisation des réseaux moléculaires complexes de la résistance à la maladie
- ❖ Des possibilités multiples pour révéler la variabilité de l'arsenal de défense de la plante

## La résistance du tabac à *Phytophthora parasitica*



HR et SAR



Age Related Resistance

Activité extracellulaire cytotoxique sur les zoospores de *Phytophthora*

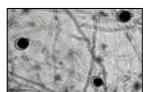
## Mort cellulaire et interactions Plantes-Pathogènes

### •La réaction d'hypersensibilité chez le partenaire végétal



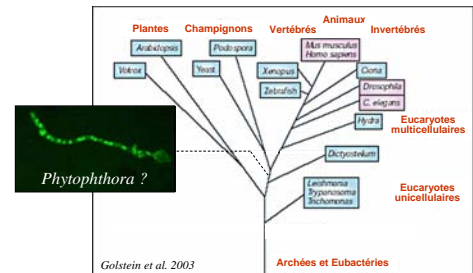
- une mort cellulaire programmée
- Interaction R – Avr
- Une bouffée Oxydante
- Résistance aux pathogènes avirulents

### •Chez le partenaire microbien?



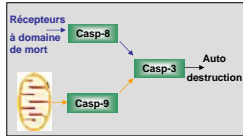
- une mort cellulaire programmée
- déterminisme
- Réponses cellulaires
- Régulation de l'interaction

## La mort cellulaire programmée à travers les règnes



## Phénoménologie et mécanismes de la mort cellulaire

### 1 Type apoptotique



- Réduction du volume cellulaire
- Maintenance partielle de l'imperméabilité membranaire
- Permeabilisation de la membrane externe des mitochondries
- Condensation de la chromatine
- Fragmentation de l'ADN
- Segmentation et formation des corps apoptotiques

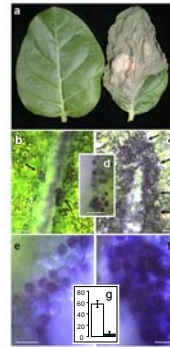
### 2 Type autophagique Type vacuolaire

- Formation d'autophagosomes
- Présence de grandes vacuoles

### 3 Type nécrotique

- Augmentation du volume cellulaire
- Gonflement des mitochondries

## La mort des cellules de *Phytophthora* in planta

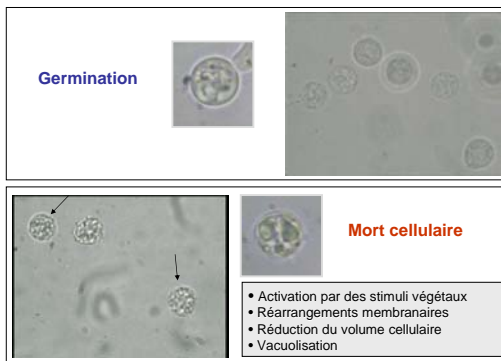


← Infection par la blessure

← Aggrégation des zoospores au site d'infection

← Mort cellulaire au cours de l'ARR

## La mort des cellules de *Phytophthora* in vitro

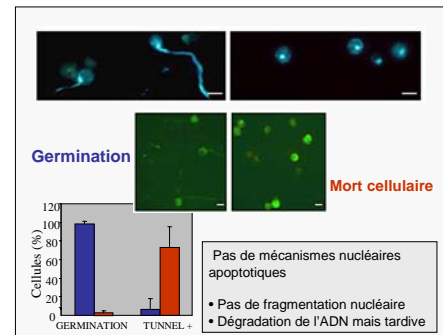


Germination

Mort cellulaire

- Activation par des stimuli végétaux
- Réarrangements membranaires
- Réduction du volume cellulaire
- Vacuolisation

## Le noyau



Germination

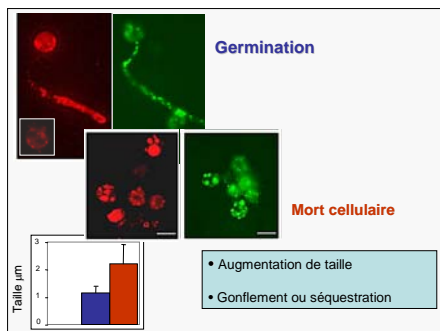
Mort cellulaire

Cellules (%)

GERMINATION TUNNEL+

- Pas de mécanismes nucléaires apoptotiques
- Pas de fragmentation nucléaire
- Dégradation de l'ADN mais tardive

## Les mitochondries



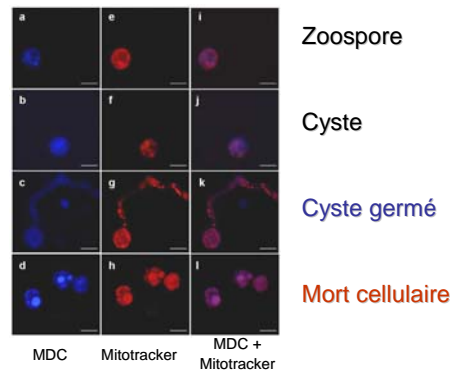
Germination

Mort cellulaire

Taille  $\mu\text{m}$

- Augmentation de taille
- Gonflement ou séquestration

## Les vacuoles



Zoospore

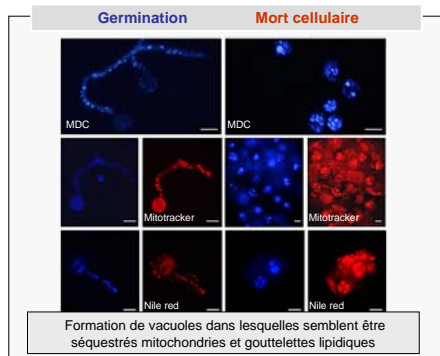
Cyste

Cyste germé

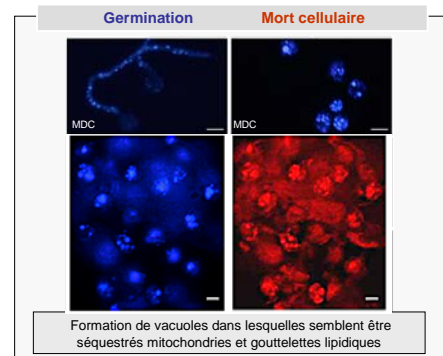
Mort cellulaire

MDC Mitotracker MDC + Mitotracker

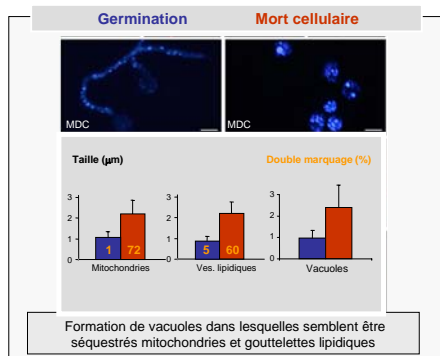
### Formation de vacuoles autophagiques



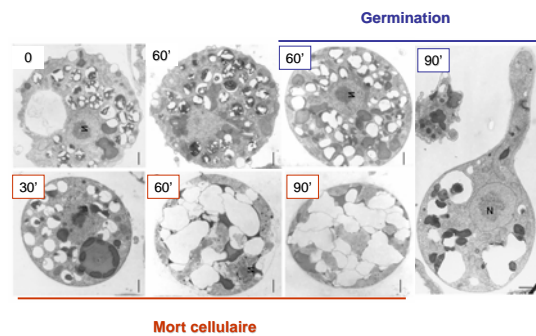
### Formation de vacuoles autophagiques



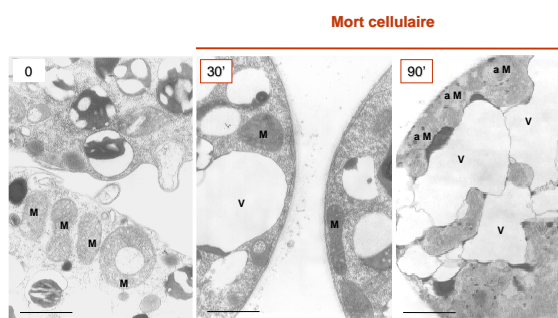
### Formation de vacuoles autophagiques



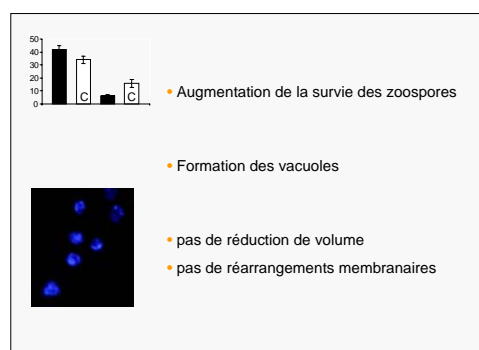
### L'ultrastructure de la mort cellulaire 1



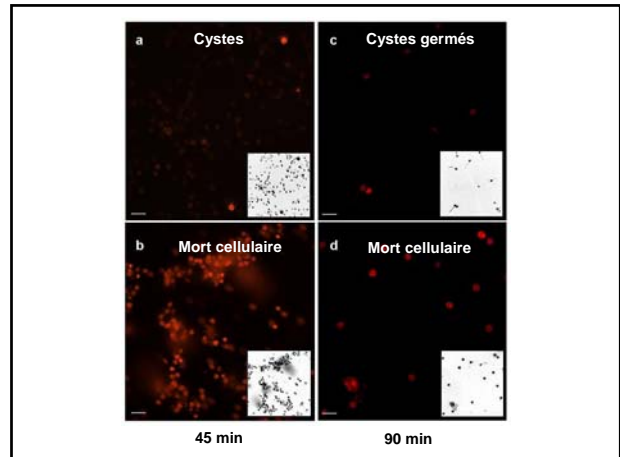
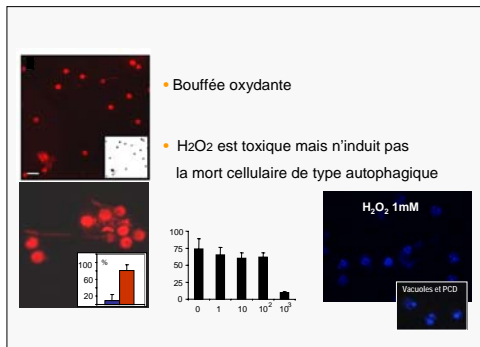
### L'ultrastructure de la mort cellulaire 2



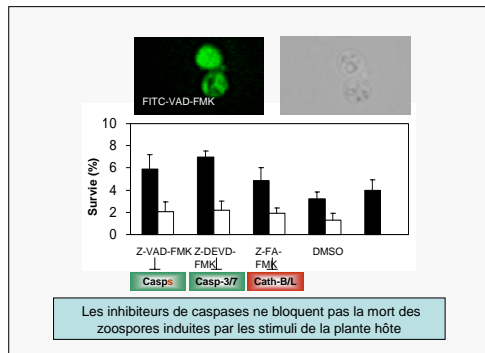
### Effets de la cycloheximide



### Accumulation intracellulaire de formes actives de l'oxygène

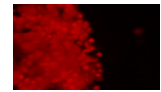


### L'implication de caspases ?



### Conclusions

- La plante hôte induit chez *Phytophthora parasitica* une PCD de type vacuolaire
- Bouffée oxydante, indépendance à l'activation de caspases



### Implications

- La PCD d'un microorganisme phytopathogène, comme la HR, est un élément du complexe qui régule les interactions plantes pathogènes
- La balance mort cellulaire-survie est critique pour la pathogénie de *Phytophthora*

### Questions en suspens

#### Elicitation

- Carences en nutriments
- Réponse à une molécule végétale

Les protéines de tabac comicoïdes PR1, PR2, PXS...  
M.P. Rivière

#### Execution

- Meta/paracaspases
- Autophagie
- réponses cellulaires

Collection ESTs  
• Mycelium  
• Interaction  
• Mort cellulaire



Laure Boudier  
Marie-Pierre Riviere  
Catherine Etienne  
Emmanuel Baudouin

UMR INRA-UNSA-CNRS, Sophia Antipolis



Pierre Gounon  
Sophie Pagnotta

Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA)  
Université de Nice-Sophia Antipolis

**La résistance liée à l'âge des plantes vis-à-vis de *Phytophthora* :  
étude des fonctions extracellulaires chez *Nicotiana tabacum***  
Marie-Pierre Rivière

UMR INRA / Univ. Nice-Sophia Antipolis / CNRS : Interactions Plantes  
Microorganismes et Santé Végétale INRA 400 route des Chappes - BP 16706903  
SOPHIA ANTIPOLIS CEDEX

La résistance liée à l'âge (ARR) des plantes est un phénomène mal compris au niveau génétique, moléculaire et cellulaire. Son expression requiert des modifications extracellulaires. Par exemple, chez *Nicotiana tabacum*, lors de la phase florale de croissance, des facteurs apoplastiques sensibles à la chaleur induisent chez *P. parasitica* un phénomène de mort cellulaire de type vacuolaire à des phases précoces de l'infection. Plus tardivement des modifications intercellulaires inhibent la colonisation par *P. parasitica*. Pour caractériser les fonctions extracellulaires impliquées dans l'expression de l'ARR chez le tabac, nous réalisons un travail composé de trois volets méthodologiques. (i) Nous développons une stratégie de piège de peptide signal combinée à une analyse transcriptomique afin de caractériser les gènes «de sécrétion» spécifiquement exprimés chez les plantes résistantes. Les résultats indiquent que des gènes de défense et de modifications de la paroi sont activés de manière coordonnée dans des feuilles de tabac au cours de l'expression de l'ARR, et ce avant toute infection. (ii) Pour l'étude fonctionnelle, nous générons des plantes exprimant constitutivement des ARN interférents en épingles à cheveux afin d'induire le silencing spécifique de ces gènes. (iii) Nous purifions également les protéines recombinantes correspondantes exprimées dans *Pichia pastoris* afin de caractériser leurs effets *in vitro* sur le cycle de *Phytophthora*. Les résultats concernant le gène PR-1a seront présentés. Outre la caractérisation de fonctions extracellulaires impliquées dans l'ARR, cette étude devrait donner un éclairage sur les processus de régulation apoplastique chez les plantes et sur leur influence sur la biologie des oomycètes phytopathogènes.

## Résistance acquise avec l'âge chez les plantes vis-à-vis des oomycètes

### Etudes des fonctions extracellulaires chez *Nicotiana tabacum*

IPMSV, Interactions Plantes-Oomycètes  
UMR INRA / UNSA / CNRS  
Sophia Antipolis



## Age-Related Resistance (ARR)

Modification de la sensibilité de la plante hôte, vis-à-vis d'agents pathogènes, au cours de son développement

Décrite pour de nombreux pathosystèmes

monocotylédones  
dicotylédones

bactéries  
champignons  
virus  
nématodes  
oomycètes

Manque d'études génétiques,  
moléculaires et cellulaires



Sensible



Résistante

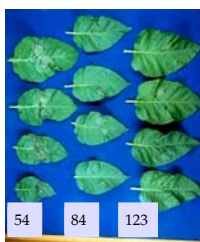
## L'ARR chez le tabac

*Nicotiana tabacum* / *Phytophthora parasitica*

Etat végétatif

plantes sensibles

100% des zones inoculées expriment des symptômes



Etat floral

plantes résistantes

50% des zones inoculées ne développent aucun symptôme

Réduction de 50 à 70% des surfaces foliaires envahies

Réduction de l'efficacité d'infection  
Limitation de la colonisation

## L'ARR chez le tabac

Acquisition de la résistance située au moment de la transition florale

Résistance de large spectre

Présence d'au moins 2 voies de transduction

Dépendante de SA  
(acide salicylique)

Colonisation

Indépendante de SA

Initiation de l'infection

Activité cytotoxique extracellulaire

## L'espace intercellulaire

✓ Croissance de l'oomycète



*Phytophthora parasitica*

✓ Reconnaissance

Sécrétion de protéines de défense (PR)



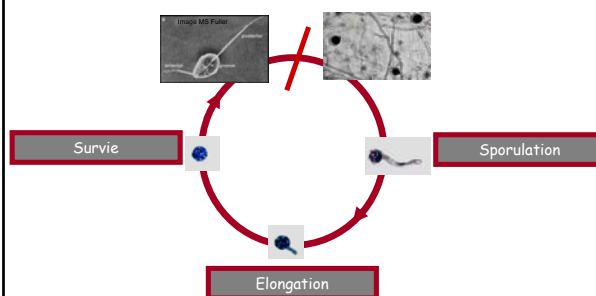
Immunolocalisation de PR-1a

✓ Activité antimicrobienne extracellulaire



Cytotoxicité sur des zoospores de *Phytophthora*

## Contrôle du cycle biologique



## Objectifs et démarche

### 1. Identifier des gènes marqueurs de l'ARR

- Identifier des gènes codant des protéines sécrétées  
→ SST
- Analyser leur expression au cours du développement  
→ Puces à ADN

### 2. Caractériser le rôle des protéines extracellulaires

- in vitro* : activité antimicrobienne
- in planta* : extinction de gènes (PTGS)

## 1. Identification de gènes marqueurs de l'ARR

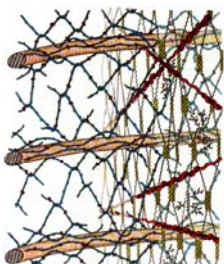
### Signal Sequence Trap

- sélection de gènes codant des protéines membranaires ou sécrétées exprimés au cours de l'ARR

131 séquences uniques

76% des protéines correspondantes sont sécrétées ou membranaires

## 1. Identification de gènes marqueurs de l'ARR



### Signalisation

- Receptor kinase-like protein (3)
- Kinase receptor like (CHRK1)
- Lipid transfer protein

### Modification de la paroi

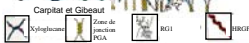
- Pectin méthylesterase
- Pectin esterase
- Pectin acétylase
- Lignin-forming peroxidase (LFP)
- Cell wall protein (TLRP)
- Cysteine-rich extensin-like protein

### Défense

- PR2
- osmotin like protein (PR-5d)

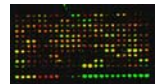
### Réponses aux stress

- NTCP-23
- wound inducible aspartic proteinase
- PAR-1a, PAR-1b
- Elicitor inducible protein



## 1. Identification de gènes marqueurs de l'ARR

Analyse transcriptionnelle des gènes sélectionnés par SST



6 gènes induits dans les feuilles de tabac à l'état floral

PR-1a  
PR-2

TLRP  
LFP

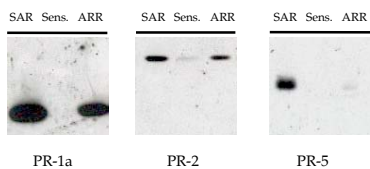
CPR2  
2H01

→ Défense  
Modification de la paroi

## 1. Identification de gènes marqueurs de l'ARR

### Immunoblot

fluides intercellulaires de feuilles de tabac à l'état floral



## 1. Identification de gènes marqueurs de l'ARR

### Approche protéomique

Michel PONGHET (INRA Sophia Antipolis)  
Didier MARION (INRA Nantes)

Identification de protéines sécrétées au cours de l'ARR

Lignin forming peroxidase

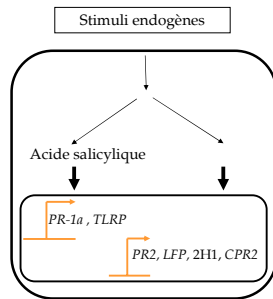
PR-2

## 1. Identification de gènes marqueurs de l'ARR

➤ Gènes corégulés

➤ Signalisation

➤ Protéines à activité antimicrobienne



## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

### Modifications intercellulaires

Plante hôte	Agent pathogène
Appositions pariétales -protéines -callose -lignine -...	Appositions pariétales?
Activité cytotoxique	Altération de la paroi?

Défense? Développement?

## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

PR-1a	Fonction biochimique inconnue activité antimicrobienne
PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase activité antimicrobienne
TLRP	Tyrosine- and Lysine-Rich Protein architecture de la paroi
LFP	Lignin-Forming Peroxidase lignification de la paroi

## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

### Analyses *in vitro*

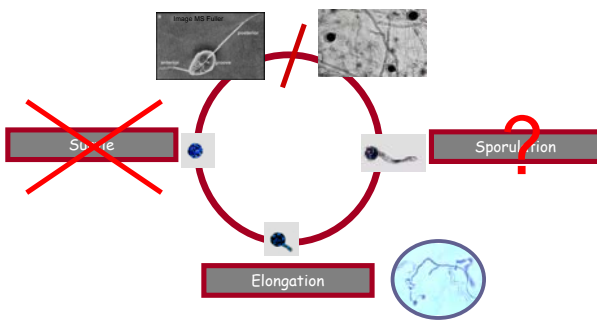
Expression des protéines en système hétérologue et purification

Tests antimicrobiens (20  $\mu$ l)  
100 à 500 zoospores /  $\mu$ l  
différentes concentrations de protéine

Observations  
survie des zoospores  
ramification  
développement du mycelium

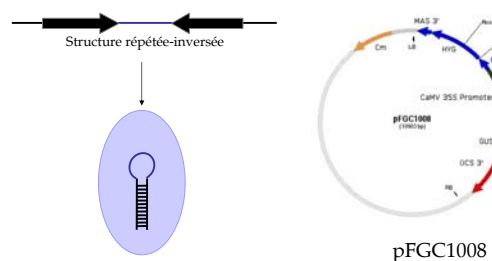
## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

Analyses *in vitro* résultats préliminaires PR-1a



## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

PTGS des gènes marqueurs de l'ARR  
(Post Transcriptional Gene Silencing)





## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

### PTGS des gènes marqueurs de l'ARR

- Clonage
- Transformation par *Agrobacterium tumefaciens*
  - pFGC
  - pFGC-PR-1a
  - pFGC-TLRP
  - pFGC-LFP
- Analyses
  - phénotypiques
  - moléculaires
  - cellulaires

## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

PR-1a première génération  
TLRP et LFP régénération de transformants



TLRP  
LFP



PR-1a

## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

### PTGS

- Screening
  - Dégradation de l'ARNm endogène
  - Diminution de l'accumulation de la protéine dans l'espace extracellulaire
  - Tests enzymatiques
- Phénotype
  - Croissance
  - Floraison / Quantité de graines produites
  - Germination
- Expression de l'ARR
  - Développement de *Phytophthora* sur les transformants âgés
  - Présence de l'activité cytotoxique

## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

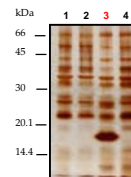
### Accumulation de la protéine dans l'espace intercellulaire

#### Screening

Phénotype

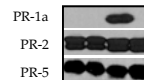
ARR

### PR-1a



1, 2, 4 transformés pour le PTGS de PR-1a  
3 transformant contrôle

70 % des plantes transformées sont silencées



Silencing spécifique de PR-1

## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

### Accumulation de l'ARNm endogène

#### Screening

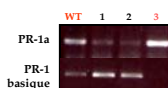
Phénotype

ARR

### PR-1a

- Prélèvement de feuille
- Traitement à SA 1mM, 36h
- Extraction des ARN totaux

RT-PCR



1, 2 transformés pour le PTGS de PR-1a  
3 transformant contrôle  
WT plante sauvage

Silencing spécifique des gènes codant les PR-1 acides

## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

#### Screening

Phénotype

ARR

### PR-1a

> 70 % des plantes transformées sont silencées

> Le silencing est spécifique par rapport aux autres protéines PR au sein de la famille PR-1

> 75% de l'ARNm endogène est dégradé

> L'accumulation de la protéine dans l'espace intercellulaire est réduite de 73 à 93 %

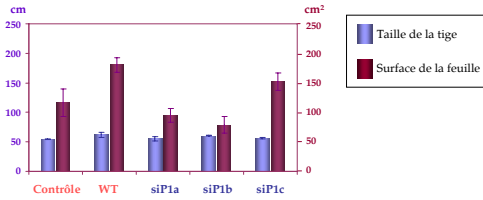
plantes silencées : 20ng/µg de protéines totales  
plantes contrôles : 200ng/µg de protéines totales

## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

Screening  
Phénotype  
ARR

Croissance  
Floraison/Quantité de graines produites  
Germination

### PR-1a



Aucun phénotype pléiotropique

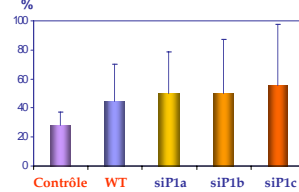
## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

Screening  
Phénotype  
ARR

Développement de *Phytophthora* sur les transformants âgés

### PR-1a

Efficacité de l'infection



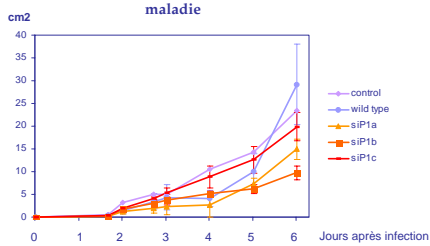
## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

Screening  
Phénotype  
ARR

Développement de *Phytophthora* sur les transformants âgés

### PR-1a

Cinétique de développement de la maladie



## 2. Déterminer le rôle des protéines extracellulaires

Screening  
Phénotype  
ARR

PR-1a

Pas d'altération de l'expression de l'ARR

Faible activité antimicrobienne de PR-1a

Redondance fonctionnelle

Les protéines de l'espace extracellulaire agissent en synergie

Analyses cellulaires

## Conclusion

### L'ARR

associée à des modifications intercellulaires

mécanismes différents de ceux mis en jeu dans d'autres formes de résistance

### Rôle de PR-1a

Pas d'impact du silencing sur l'expression de la résistance

### Rôle de TLRP et LFP?

INRA Sophia Antipolis

Eric GALIANA  
Antoines MARAIS  
Gilles ARBIOL  
Catherine ETIENNE

BASF plateforme génomique

Catherine WEISS  
Joseph COZZITORTO  
Genichi KAKIFUDA

INRA Jouy en Josas

Karine HUGOT

Plateforme génomique INRA / CNRS

René FEYEREISEN / Pascal BARBRY

## **Analyse de l'expression des gènes de *Plasmopara viticola* impliqués au cours de son interaction avec la vigne**

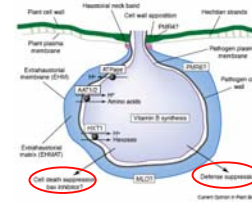
Pere Mestre

Laboratoire de Génétique et Amélioration de la Vigne. UMR SVQV INRA/ULP.  
28 rue de Herrlisheim, BP 507. 68021 Colmar.

L'objectif de ce projet est l'identification des facteurs pathogéniques putatives chez *Plasmopara viticola* et l'étude des réponses qu'ils induisent quand ils sont exprimés dans des feuilles de vigne. Sur la base que les facteurs pathogéniques sont normalement induits au cours de l'infection, notre stratégie est d'obtenir une banque de cDNA de *P. viticola* enrichie en séquences induites au cours de l'infection. D'autre part, en fonction des connaissances apportées par d'autres interactions plante-oomycete mieux étudiées, nous chercherons des séquences homologues chez *P. viticola*. À travers l'expression de ces protéines dans des plantes de vigne sensibles au mildiou, on s'attend à découvrir la contribution de chacun de ces facteurs à l'altération du métabolisme de l'hôte. Par ailleurs, l'expression dans des plantes résistantes au mildiou conduira à l'identification des déterminants d'avirulence par rapport aux différents gènes de résistance qui existent chez la vigne.

## Analyse de l'expression des gènes de *Plasmopara viticola* impliqués au cours de son interaction avec la vigne

## Biotrophie et Haustoria



Panstruga (2003) Curr Opin Plant Biol 6: 320-326

## Objectives

Gènes de *P. viticola* induits au cours de l'infection

Gènes de virulence

Déterminants d'avirulence par rapport à gènes de résistance

## Résistance gène-à-gène

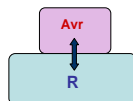
PATHOGENE

Avr

R

PLANTE

## Exemples chez les biotrophes



Pathogène	Avr	R	Plante
<i>Melampsora lini</i>	Avr567	L6	Lin
<i>Phytophthora infestans</i>	Avr3a	R3a	Pomme de terre
<i>Hyaloperenospora parasitica</i>	ATR13	RPP13	Arabidopsis

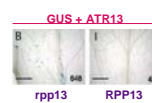
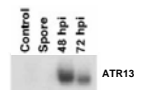
## Avr567, Avr3A, ATR13

- Protéines petites (150aa, 147aa, 187aa)

- Peptide signal

- Induites au cours de l'infection

- Expression transitoire cause réponse d'hypersensibilité en présence du gène de résistance

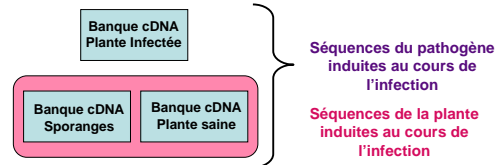


## Plan de travail

1. Isolation des gènes de *P. viticola* induits au cours de l'infection
2. Identification des gènes candidats
3. Expression transitoire des gènes candidats chez la vigne

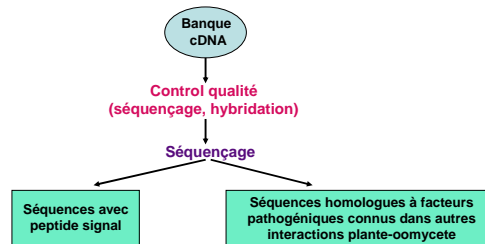
## Plan de travail

1. Isolation des gènes de *P. viticola* induits au cours de l'infection



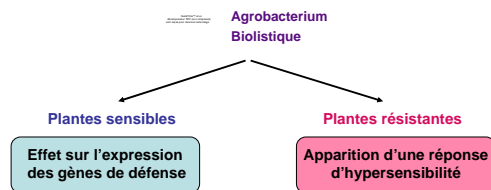
## Plan de travail

2. Identification des gènes candidats



## Plan de travail

3. Expression transitoire des gènes candidats chez la vigne



## Résultats attendus

- Données de séquence de *P. viticola*
- Identification de facteurs pathogéniques de *P. viticola*
- Identification des déterminants d'avirulence par rapport aux gènes de résistance au mildiou chez la vigne, en particulier *Rpv1* et *Rpv2*.

**Mobilisation des défenses de la vigne au cours de son interaction compatible et incompatible avec *Plasmopara viticola* : influence du resvératrol et de ses dérivés**  
Anne Poutaraud

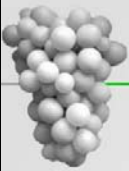
Laboratoire de Génétique et Amélioration de la Vigne. UMR SVQV INRA/ULP.  
28 rue de Herrlisheim, BP 507. 68021 Colmar.

Ce travail s'intègre dans une thématique dont l'objectif final est la création de variétés de vignes résistantes au mildiou en vue de limiter l'utilisation de produits phytosanitaires coûteux et polluants. Le resvératrol et ses dérivés sont des stilbènes connus pour leur forte implication dans les mécanismes de défense de la vigne. Le but de ce programme de recherche est d'étudier le rôle de ces molécules dans la résistance de la vigne au mildiou conférée par différentes sources de résistance notamment *Muscadinia rotundifolia*, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*.


De nombreuses recherches ont déjà été menées sur le resvératrol et ses dérivés tant dans le vin (pharmacologie) que chez la vigne (interaction hôte - pathogène, principalement sur *Botrytis cinerea*). Cependant, il n'existe pas d'analyse génétique reliant la teneur en resvératrol au niveau de résistance.

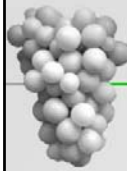
Le premier volet de ce projet vise à réaliser des mises au point méthodologiques. Elles concernent notamment l'adaptation d'une technique d'extraction et de dosage de la majeure partie des stilbènes présents dans les feuilles de vigne après inoculation par *Plasmopara viticola* ou induction aux UVC, l'étude de l'influence du stade de la plante et du niveau de la feuille sur la synthèse, la cinétique de synthèse des stilbènes selon le génotype.

Le deuxième volet aura pour objectif l'étude de populations ségréantes caractérisées pour leur niveau de résistance au mildiou. Nous chercherons à identifier des QTL déterminant la variation de la teneur des différentes molécules analysées et à les localiser sur la carte génétique. Des colocalisations avec les QTL de résistance déjà identifiés mais aussi avec des gènes candidats issus de la voie de biosynthèse des phytoalexines (stilbène synthases, peroxydases, méthyltransférases) seront également recherchées.




**Mobilisation des défenses de la vigne au cours de son interaction compatible et incompatible avec *Plasmopara viticola* : influence du resvératrol et de ses dérivés**


ulp 



**Plan**


- Introduction
  - La vigne
  - Le resvératrol et ses dérivés
- Le rôle du resvératrol et de ses dérivés dans la résistance de la vigne au mildiou
  - Objectif du projet
  - Premiers résultats
- Perspectives


ulp 



**La vigne**


- 3% des surfaces cultivées en France  
50% des produits phytosanitaires
- 8 à 12 traitements fongicides
  - pour le mildiou (150 millions d'euros)
  - pour l'oïdium (75 millions d'euros)
- Pollutions
- Apparition de souches résistantes aux fongicides


ulp 



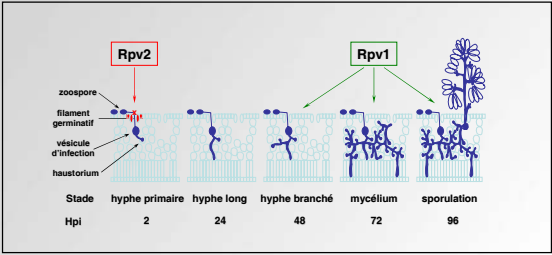
**La vigne**


- 9600 cépages différents dans le monde
- Environ 600 utilisés en viticulture
- Vignes asiatiques : *Vitis amurensis*
- Vignes américaines :  
*Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Muscadinia rotundifolia*


ulp 



**Développement de l'infection**




ulp 



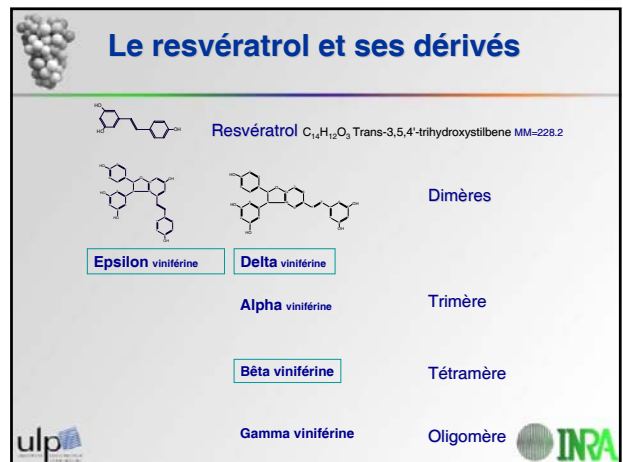
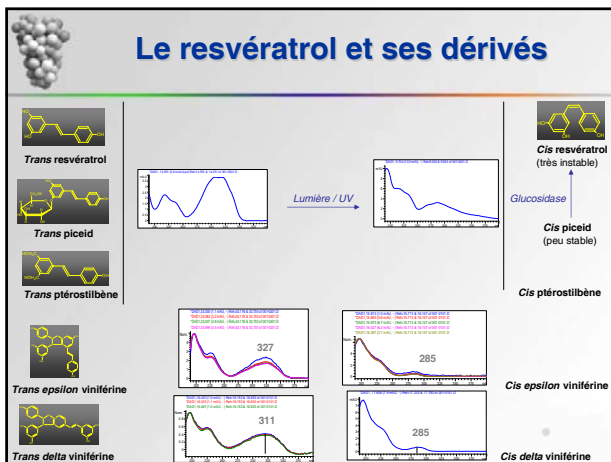
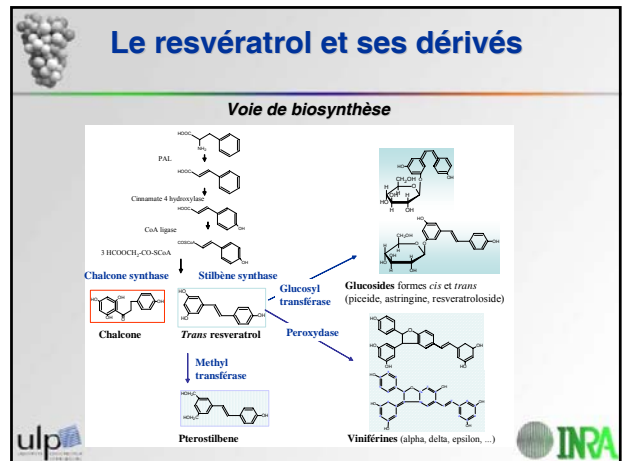
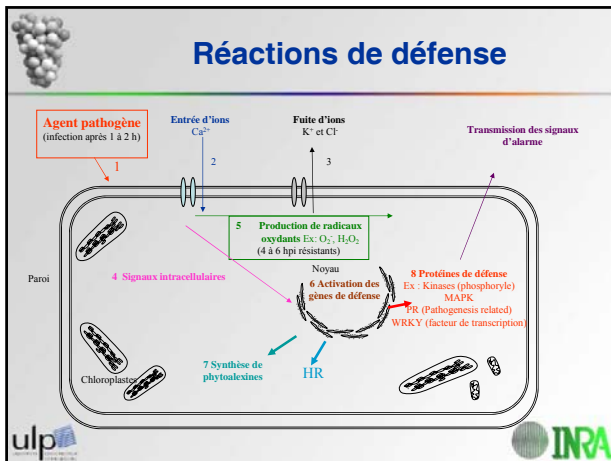
**Le mildiou**

*Développement mycélien*  
Notation visuelle Office international de la vigne et du vin OIV



Plantes **résistantes**:  
zones nécrotiques inversement proportionnelles à la résistance (8105-ds-01)

Plantes **sensibles**:  
Sporulation importante (Cabernet Sauvignon)



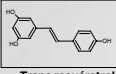
- ## Le resvératrol et ses dérivés
- Les stilbènes synthétisés
    - surface abaxiale des feuilles
    - pellicule des baies
  - Resvératrol cytoplasmique (transporteur vers extérieur des cellules)
  - Viniférines apoplastiques (espace intercellulaire)
  - Phytoalexines: synthèse inductible
- INRA

- ## Le resvératrol et dérivés / résistance
- Plantes transformées avec la STS (tomate, blé, tabac) = synthèse de resvératrol et augmentation de la résistance
  - Résistance serait conférée par une vitesse de synthèse des composés et une concentration au niveau du site d'infection
- INRA




## Le resvératrol et ses dérivés


Toxicité des stilbènes sur la mobilité des zoospores de mildiou




**Trans resvératrol**



**Trans epsilon viniférine**



**Trans delta viniférine**



**Trans ptérostilbène**

ED50

192µM

Faible



73µM

14µM

Forte

28µM



Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Richter, H., 2004. Effect of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis*.43 (2), 145-148.


## Stilbènes et résistances


*Modes d'action des stilbènes sur les champignons*


- Inhibition d'exoenzymes lytiques du champignon (cellulase, laccase, pectinase)
- Blocage de la respiration par des agents découplants
- Inhibition de la germination des conidies
- **Dégradations des membranes** : membrane mitochondriale ≥ membrane nucléaire > membrane du réticulum endoplasmique > membrane cytoplasmique

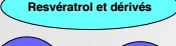




## Objectif général du projet






























## Objectif général du projet























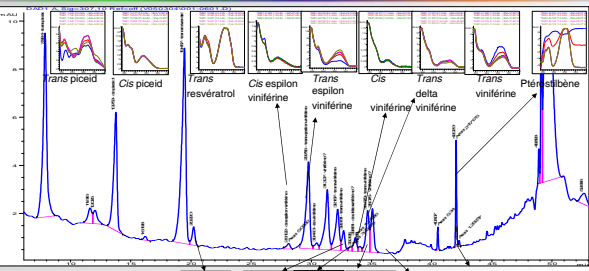


HPLC

## Mise au point méthodologique

Méthode HPLC-DAD



?

Trans Viniférine ?



Cis Viniférine ?

?

Trans Viniférine ?

?

Trans Viniférine ?

## Les biais expérimentaux

Prélèvement des feuilles de vigne

Inoculation

Récolte



Stockage

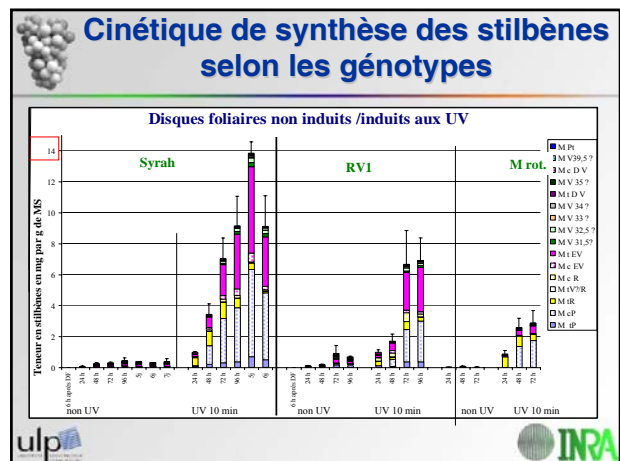
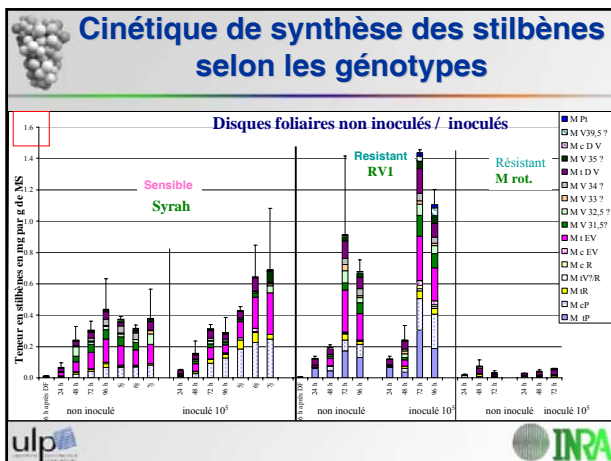
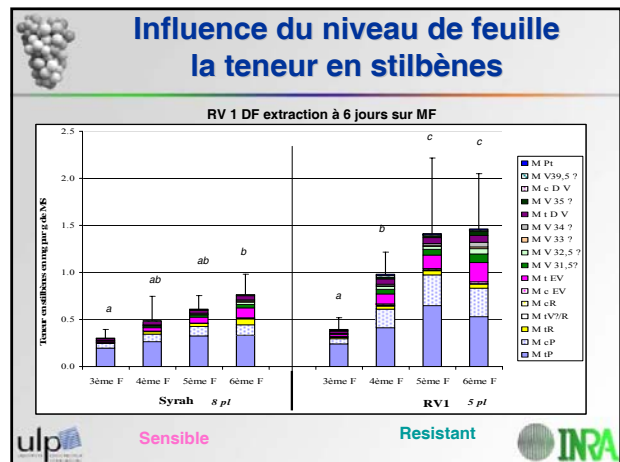
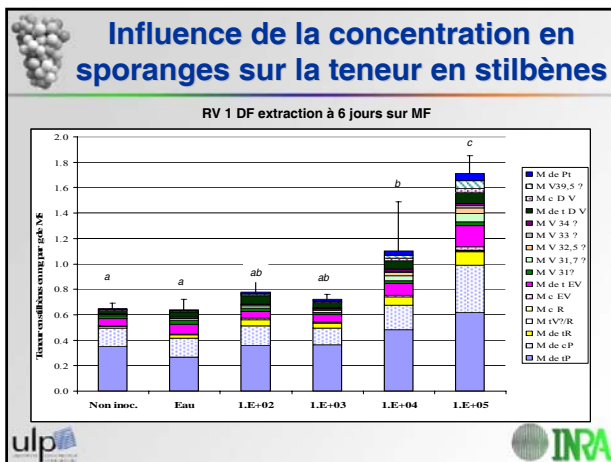
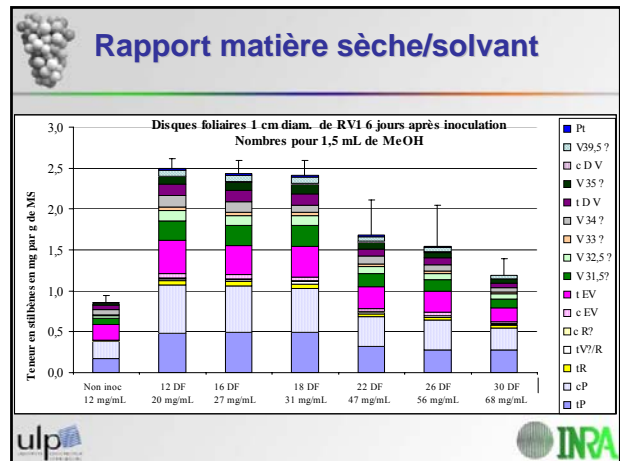
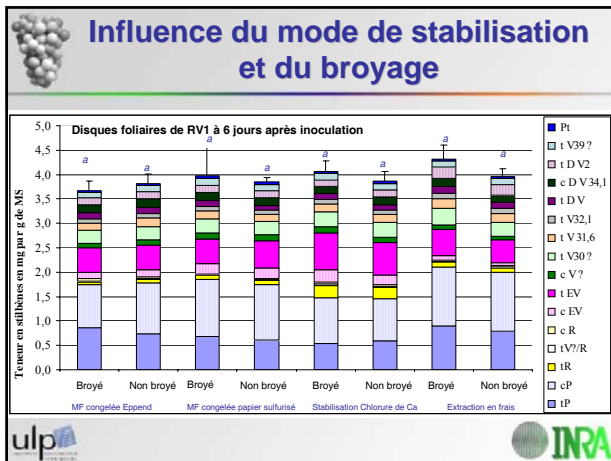
Extraction

Dosage


Expression des résultats

- Age des plantes
- Conditions de culture (lumière, produits phytosanitaires, stress...)
- Matériel inoculé (feuille entière, disque foliaire)
- Concentration en spores
- État de l'inoculum
- Mode d'inoculation (spray, gouttes)
- Délai après induction
- Dilution de la réponse ?
- Durée
- Température
- Type de solvant
- Rapport matière frais/sèche / solvant
- Température
- Méthode
- Stabilité des molécules
- Mode d'agrégation des résultats

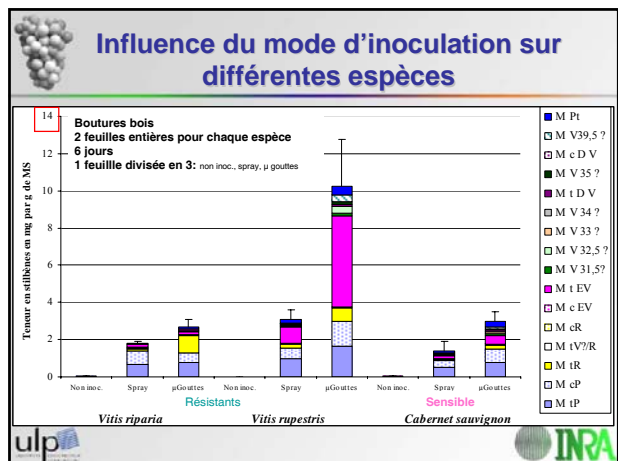





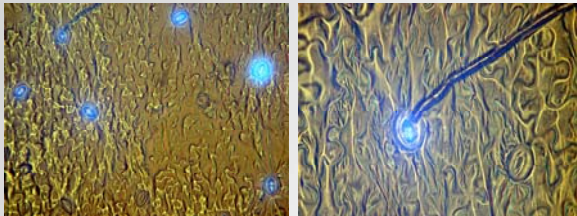
## Modes d'inoculation



ulp INRA



## Problème méthodologique : dilution de la réponse



ulp INRA

## Conclusion

- De nombreux facteurs interviennent sur la synthèse de stilbènes : niveau de la feuille sur la plante, UV, blessure ...
- Les stilbènes ne sont pas répartis de façon homogène sur une feuille inoculée.  
*Phénomène de dilution*

ulp INRA

## Perspectives

- Pondérer la teneur en stilbènes obtenus afin de se rapprocher de la teneur au niveau du site d'infection
- Mesurer pour un même échantillon le maximum de critères susceptibles de caractériser la résistance :
  - la taille des nécroses
  - le nombre de stomates / stomates infectés
  - la teneur en stilbènes
- Comparer la cinétique de synthèse des stilbènes sur une gamme de génotypes de niveaux de résistance différents

ulp INRA

## **Recherche de variabilité moléculaire chez *Plasmopara halstedii*.**

Jeanne Tourvieille

UMR « ASP », Institut National de la Recherche Agronomique,  
234 avenue du Brézat, 63100 Clermont-Ferrand.

L'approche RAPD, conduite depuis 1995, nous a permis d'établir une phylogénie entre 75 isolats de *Plasmopara halstedii* recueillis à travers le monde. L'évolution très rapide du pathogène (8 nouvelles races ces 4 dernières années en France) d'une part, et notre souhait d'étudier l'évolution de populations parasites soumises à différentes pressions de sélection (monoculture de gènes *Pl*, pyramidage, alternance ou assemblage) d'autre part, nous oblige à rechercher d'autres outils moléculaires d'analyse de la variabilité.

Les différentes approches (AFLP, EST, ...) sont passées en revue. Les résultats décevants nous conduisent à envisager la recherche de « microsats » spécifiques du *Plasmopara halstedii*.

Roeckel-Drevet, P., Tourvieille, J., Gulya, T. J., Charmet, G., Nicolas, P., and Tourvieille de Labrouhe, D. (2003). Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from different continents. *Can. J. Microbiol.* 49, 492-502.

INRA

# Réunion « Oomycètes »

## Recherche de la variabilité moléculaire chez *Plasmopara halstedii*

J. Tourvieille

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

INRA

### ❖ Objectifs

- L'analyse RAPD
- Les autres approches
- Perspectives

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

INRA

### I. Structuration des populations parasitaires

Jusqu'à la fin des années 80, en France, on ne connaissait qu'une race de *P. halstedii*, puis une dizaine d'années plus tard, une explosion de nouvelles races s'est produite. Actuellement on dénombre pas moins de 12 races.

Certains races ont été décrites à l'étranger (300, 700, 703 et 710) d'autres ne semblent être présentes qu'en France (304, ..., 714)

1966	100
1988	710
1989	703
1995	300 700
2000	304 <sup>a</sup>
2001	314
2002	307 704
	304 <sup>b</sup> 714
2004	334

\* Quels sont les liens phylogénétiques entre ces différents pathotypes ?

\* Importance des introductions accidentelles et structuration des populations ?

\* Outils de diagnostic moléculaire

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

INRA

### II. Dynamique d'une population soumise à une pression de sélection

Une population parasitaire évolue différemment selon la pression de sélection appliquée par l'utilisation de tel ou tel gène de résistance monogénique.

\* Quel est le rôle du brassage génétique dans l'apparition de nouvelles virulences ?

\* Mesure de la distance génétique des populations soumises à différentes pressions ?

\* Éléments de prédiction du risque d'apparition de nouvelles virulences.

	Pathotypes	
	Année n	Année n+4
Ref. H1	100, 710	710
Multi Hyb.	100, 710	710
Alternance	100, 710	710
Pyram.H2	100, 710	710, 704
Pyram.H3	100, 710	710, 704, 710
Pyram.H4	100, 710	304, 314

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

INRA

Matériel biologique disponible

### I. Structuration des populations parasitaires

France : Isolats récoltés dans le cadre de la prospection nationale du SPV réalisée dans le cadre de la lutte obligatoire vis-à-vis d'un parasite de quarantaine

Monde : Échantillons conservés dans l'éthanol d'isolats récoltés par des collègues Pathologistes

### II. Dynamique d'une population soumise à une pression de sélection

Population d'origine : Un isolat de la race 100 et un isolat de la race 710 + cinq souches « monosporanges » de chaque isolat.

20 souches (en moyenne) récoltées par traitement et par année d'expérimentation représentative des populations parasitaires

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

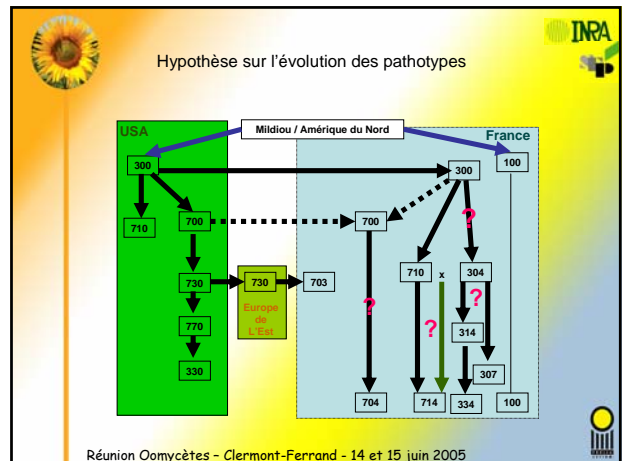
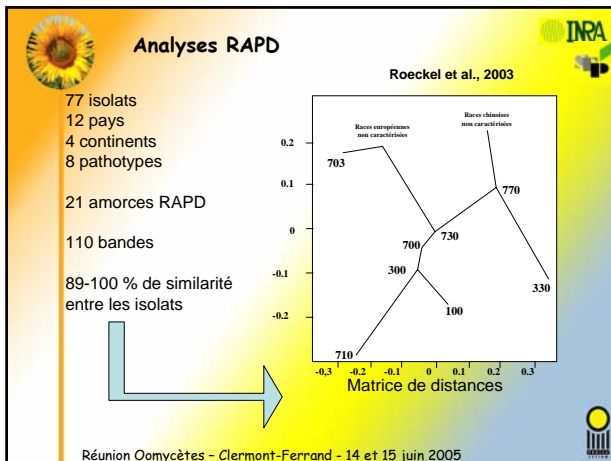
INRA

Les observations en culture

### ❖ Objectifs

- L'analyse RAPD
- Les autres approches
- Perspectives

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005



### Bilan de l'approche RAPD

Très peu d'amorces donnent du polymorphisme  
Quelques unes donnent des résultats stables, d'autres non.

Amorce GO2

Elle permet de séparer les races de mildiou en trois catégories :

- La race 710 : 1 bande
- La race 330 américaine : les 2 bandes
- Toutes les autres races : 1 bande

Présence d'une délétion d'environ 150 pb pour la race 710

Défauts :

- Elle ne permet pas de différencier les mélanges de races !
- Beaucoup d'ADN nécessaire!

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

### Amorce OPJ15

Nous avons mis en évidence un SCAR d'environ 1kb commun à tous les isolats de *P. halstedii*. Il nous a permis de construire des amorces PCR utilisables pour diagnostiquer la présence du mildiou dans les semences de tournesol. Spécifiques de *Plasmopara*, elles n'amplifient aucun des autres parasites du tournesol.

Après séquençage des fragments amplifiés, nous voyons un peu de polymorphisme entre les races. Nous avons cherché à le mettre en évidence. Des amorces internes ont été dessinées mais une amplification est obtenue encore avec toutes les races, même si la bande obtenue est plus courte 700 pb et très nette.

De nouvelles amorces vont permettre d'amplifier le SCAR en plusieurs morceaux, ce qui nous permettra, peut être, de mettre en évidence un polymorphisme utilisable.

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

- ### Les observations en culture
- Objectifs
  - L'analyse RAPD
  - ◆ Les autres approches
  - Perspectives
- Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

- ### AFLP
- Elle devrait permettre de mettre en évidence plus de polymorphisme
    - Beaucoup de bandes générées
  - 18 couples d'amorces ont été utilisés sur les races 100 et 710
  - 370 bandes ont été décomptées.
  - 5 sont peut être polymorphes!
  - Difficultés :
    - Quantité variable d'ADN de tournesol dans les échantillons!
      - Beaucoup de bandes tournesol
    - amorces utilisées sélectionnées sur le maïs
      - amplification du mildiou mais aussi le tournesol et comme les concentrations en tournesol variables, les bandes plus ou moins amplifiées
        - la lecture des résultats délicate!
        - Nécessité de passer d'autres amorces
- Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

## EST « *Plasmopara halstedii* »

Banque BAC fabriquée par l'université B. Pascal à partir de la race 300

145 séquences de *Plasmopara halstedii*

BLASTX

Homologie très significative (35 %)

Homologie non significative (40 %)

Homologie significative (25 %)

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

## EST « *Plasmopara halstedii* »

24 couples d'amorces susceptibles d'amplifier des gènes putatifs du pouvoir pathogène ont été sélectionnés

Description	P-Value	Espèces
<b>Métabolisme cellulaire</b>		
isocitrate déshydrogénase	1E-58	<i>Nicotiana tabacum</i>
phosphate-G-6-phosphate isomérase	5E-53	<i>Arabidopsis thaliana</i>
FT-ATP synthase	4E-97	<i>Arabidopsis thaliana</i>
NADP Kinase	5E-50	<i>Homo sapiens</i>
<b>Structure de la cellule</b>		
actin	2E-51	<i>Pythium irregulare</i>
pectin-siam channel beta subunit	1E-46	<i>Phytophthora infestans</i>
osmaporta	1E-23	<i>Rattus norvegicus</i>
<b>Métabolisme protéique</b>		
40S ribosomal protein S-2a	1E-71	<i>Brassica rapa</i>
60S ribosomal protein L10	3E-82	<i>Drosophila melanogaster</i>
20S proteasome subunit beta 7	6E-20	<i>Danio rerio</i>
20S proteasome subunit 4-ATPase	9E-53	<i>Arabidopsis thaliana</i>
tefl elongation factor	1E-108	<i>Phytophthora infestans</i>
initiation factor 5A-3 (eIF-5A 3)	2E-23	<i>Arabidopsis thaliana</i>
cyclophilin D	5E-62	<i>Dicystotium discoideum</i>
<b>Transduction du signal</b>		
pyrophosphatase	2E-57	<i>Phytophthora infestans</i>
acide-thyrosine kinase	3E-10	<i>Neisseria sp. PC 7130</i>
calcivectin	1E-43	<i>Pythium splendens</i>
CTF binding protein	9E-92	<i>Phytophthora infestans</i>
<b>Respiration aérobie</b>		
thioesteron peroxydase	1E-102	<i>Phytophthora infestans</i>
superoxyde dismutase	4E-42	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
glutathion transférase	7E-22	<i>Arabidopsis thaliana</i>
hsp 70	3E-68	<i>Bremia lactucae</i>
<b>Éliciteur</b>		
élicitor	1E-14	<i>Phytophthora megasperma</i>
pectin méthylésterase	1E-23	<i>Cochliobolus carbonum</i>

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

## EST « *Plasmopara halstedii* »

21 ont donné un même amplifiat avec toutes les races de mildiou sur gel d'agarose ou de polyacrylamide. 3 n'ont rien donné.

Exemple avec un couple codant pour un éliciteur :

Amplification de toutes les races de mildiou avec les amorces de la pectine methyl esterase de *Cochliobolus carbonum* sur gel d'agarose

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

## Autres amorces publiées

Equipe Dr Riethmuller et al.

Dendrogramme sur les oomycètes et en particulier sur les *Plasmopara* fait à partir des adn qui codent pour la lsu du ribosome. A partir des banques en ligne, amorces qui devraient amplifier uniquement les *Plasmopara*.  
Fragment d'environ 350pb

Avantages :  
Ces amorces amplifient avec très très peu d'ADN quelques nanog

Problèmes :  
Peu de polymorphisme déjà entre espèces  
Aucune différence entre les différentes races après séquençage!  
Espoir :  
Tout le morceau n'est pas entièrement séquençé!

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

## Autres amorces publiées

Equipe Spring et al.

Emploi d'un certain nombre de minisatellites et d'amorces pour des simples répétitions de séquences afin d'étudier la variabilité d'une population de mildiou prélevée dans un champ de tournesol.

Peu de polymorphisme mis en évidence  
Peu du polymorphisme lié essentiellement à l'amplification d'une amorce appelée T3 seule ou associée à d'autres.  
Pas de mention de témoin tournesol dans la publication.

Problèmes:  
Nous avons fait fabriqué ces amorces. Il apparaît que cette T3 amplifie le mildiou mais également le tournesol !  
Le polymorphisme observé est lié à la présence, en plus ou moins grande quantité, de tournesol ce qui, comme dans les manipulations AFLP, empoisonne la lecture des résultats.

Espoirs :  
D'autres couples donnent une seule bande avec le mildiou  
Séquençage et recherche de snp avec les races retrouvées dans les tunnels!



Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005

## Microsats

Equipe de Greif et al.




Nous avons utilisé les microsats de *Plasmopara viticola* sans succès.

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005



- Objectifs
- L'analyse RAPD
- Les autres approches
- ✦ **Perspectives**

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005




### Conclusions et perspectives

Peu de polymorphisme mis en évidence

- Panne en BM
  - Nécessité de rechercher des microsats de *Plasmopara halstedii* ou *snp* ou?
- Matériel biologique
  - Beaucoup de souches en quantité suffisante
  - Bien typées (virulence) toutes passées sur les testeurs

Du travail en perspectives et des euros !!!!

Réunion Oomycètes - Clermont-Ferrand - 14 et 15 juin 2005





**Point sur la production et l'exploitation de banques ADNc de  
*Plasmopara viticola*.**

**État des lieux et projets au sein du groupe Oomycètes.**

Charles Greif

### **Banques cDNA de *Plasmopara viticola***

#### **Intérêts de la production de banques cDNA du pathogène**

- génomique de l'interaction vigne-mildiou
- génomique de la résistance aux fongicides
- autres ?

#### **Quelles banques cDNA produire en priorité ?**

- mycélium, autres structures intratissulaires  
=> banques soustractives
- sporanges
- zoospores en germination
- autres ?

### **Données de séquences et banques cDNA d'oomycètes**

#### **Bases de données de séquences**

*Phytophthora* Genome Consortium  
Syngenta *Phytophthora* Consortium  
Joint Genome Institute *Phytophthora sojae* Database  
*Phytophthora* Functional Genomics Consortium  
Autres ?

#### **Banques de cDNA (ou EST)**

Sporanges (*P. inf.*) *Pl. vit.* ?Bayer; SWI  
Zoospores (*P. soj.*-EST ; *P. nic.*-EST)  
Zoospores en germination (*P. nic.*-EST)  
Mycélium (*P. inf.*-EST ; *P. soj.*-EST ; *P. par.* - EST)  
Tissus infectés (*P. soj.*-EST ; *H. par.*)

### **Projets (en cours, potentiels) pour *P. viticola***

- Banque soustractive à partir de tissus infectés  
cf. exposé de **Pere Mestre**  
=> gènes de virulence ou pouvoir pathogène
- Banque de cDNA de sporanges (réduction des contaminations)  
=> gènes de ménage  
=> ? gènes impliqués dans le processus infectieux  
même si très faiblement exprimés à ce stade
- Exploitation possible de la banque cDNA de Bayer ?
- Collaborations avec d'autres labos ?

### **Contexte plus général des programmes de génomique**

#### **Vigne**

#### **Interactions plante-pathogène**

- Séquençage du génome de la vigne
- ANR Génoplante sur des projets de génomique fonctionnelle
- Génomique des interactions vigne-pathogène  
plutôt focalisé sur le couple vigne-Botrytis...
- 7° PCRD : Programme Low Pest
- Transversalité INRA ?

#### **Point commun/originalité à défendre sur les interactions plantes-oomycètes ?**

Liste des participants à la réunion "Oomycètes" des 14 et 15 juin 2005

Nom	Prenom	Courriel	Téléphone
Cariou-Pham	Emmanuelle	<a href="mailto:emmanuelle.cariou@lin-itl.com">emmanuelle.cariou@lin-itl.com</a>	excusée
Charmet	Gilles	<a href="mailto:charmet@clermont.inra.fr">charmet@clermont.inra.fr</a>	04 73 62 43 09
Chen	Wei-Jen	<a href="mailto:wjchen@ferrade.bordeaux.inra.fr">wjchen@ferrade.bordeaux.inra.fr</a>	05 57 12 26 30
Corbière	Roselyne	<a href="mailto:Roselyne.Corbiere@rennes.inra.fr">Roselyne.Corbiere@rennes.inra.fr</a>	02 23 48 51 79
Coste	Pascale	<a href="mailto:coste@colmar.inra.fr">coste@colmar.inra.fr</a>	03 89 22 49 54
Diez	Ana	<a href="#">INRA</a>	03 89 22 49 47
Ducher	Mireille	<a href="mailto:Mireille.DUCHER@univ-bpclermont.fr">Mireille.DUCHER@univ-bpclermont.fr</a>	04 73 40 79 10
Endewelt	Kévin	<a href="#">INRA</a>	04 73 62 44 67
Fantin	Frédéric	<a href="#">Agri Obtention</a>	04 73 62 43 45
Galiana	Eric	<a href="mailto:galiana@antibes.inra.fr">galiana@antibes.inra.fr</a>	04 92 38 64 72
Greif	Charles	<a href="mailto:greif@colmar.inra.fr">greif@colmar.inra.fr</a>	03 89 22 49 68
Lefebvre	Véronique	<a href="mailto:Veronique.Lefebvre@avignon.inra.fr">Veronique.Lefebvre@avignon.inra.fr</a>	excusée
Maisonneuve	Brigitte	<a href="mailto:maisonne@avignon.inra.fr">maisonne@avignon.inra.fr</a>	04 32 72 27 43
Merdinoglu	Didier	<a href="mailto:merdino@colmar.inra.fr">merdino@colmar.inra.fr</a>	Excusé
Merdinoglu	Sabine	<a href="mailto:swm@colmar.inra.fr">swm@colmar.inra.fr</a>	03 89 22 49 47
Mestre	Pere	<a href="mailto:mestre@colmar.inra.fr">mestre@colmar.inra.fr</a>	03 89 22 49 47
Mollinéro	Valérie	<a href="mailto:valerie.molinero@geves.fr">valerie.molinero@geves.fr</a>	02 41 22 58 58
Montarry	Josselin	<a href="mailto:Josselin.Montarry@rennes.inra.fr">Josselin.Montarry@rennes.inra.fr</a>	02 23 48 58 19
Poutaraud	Anne	<a href="mailto:poutarau@colmar.inra.fr">poutarau@colmar.inra.fr</a>	03 89 22 49 47
Prado-Vivant	Emilce	<a href="mailto:prado@colmar.inra.fr">prado@colmar.inra.fr</a>	03 89 22 49 54
Rivière	Marie-Pierre	<a href="mailto:riviere@antibes.inra.fr">riviere@antibes.inra.fr</a>	04 92 38 64 72
Roche	Sylvie	<a href="mailto:roche@sancy.clermont.inra.fr">roche@sancy.clermont.inra.fr</a>	04 73 62 43 06
Serre	Frédéric	<a href="mailto:serre@sancy.clermont.inra.fr">serre@sancy.clermont.inra.fr</a>	04 73 62 43 06
Tourvieille	Denis	<a href="mailto:tourvie@clermont.inra.fr">tourvie@clermont.inra.fr</a>	04 73 62 44 45
Tourvieille	Jeanne	<a href="mailto:jtourvie@valmont.clermont.inra.fr">jtourvie@valmont.clermont.inra.fr</a>	04 73 62 48 07
Vear	Félicity	<a href="mailto:vear@sancy.clermont.inra.fr">vear@sancy.clermont.inra.fr</a>	04 73 62 43 06
Walser	Pascal	<a href="mailto:walser@sancy.clermont.inra.fr">walser@sancy.clermont.inra.fr</a>	04 73 62 44 67