

Sensibilité des grappes au mildiou: nouvelles données microscopiques et biochimiques

Katia GINDRO, Virginia ALONSO-VILLAVARDE, Francine VOINESCO, Jean-Laurent SPRING, Olivier VIRET et Pierre-Henri DUBUIS, Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW

Renseignements: Katia Gindro, e-mail katia.gindro@acw.admin.ch, tél. +41 22 363 43 74, www.agroscope.ch



Coupe transversale de fleurs de vigne au stade BBCH 53. De gauche à droite: Chasselas, Merlot, 2091, Solaris (1: calyptré = capuchon; 2: ovaire; 3: pédicelle ou pédoncule).

Introduction

Parmi les quelque dix espèces de champignons considérés comme pathogènes pour la vigne (*Vitis vinifera*), trois d'entre elles sont responsables de dégâts majeurs au vignoble: la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), le mildiou (*Plasmopara viticola*) et l'oïdium (*Erysiphe necator*). Presque tous les cépages cultivés dans le monde présentent une sensibilité plus ou moins grande à ces maladies et doivent être protégés par des applications régulières de fongicides. Des traits de résistance à ces trois champignons existent dans d'autres espèces du genre *Vitis* (Langcake 1980). La sélection de la vigne par hybridation est une des méthodes les plus prometteuses à la fois pour augmenter la diversité génétique, mais aussi pour sélectionner des caractères génétiques spécifiques, comme la résistance aux pathogènes (Pauquet *et al.* 2001; Donald *et al.* 2002). Le développement de méthodes fiables et rapides permettant de discriminer les plantules résistantes durant les processus de sélection est donc essentiel (Blasi 2010). Dans la famille des *Vitaceae*, plusieurs mécanismes de défense de la plante contre les infections fongiques ont été décrits.

L'un d'eux est la synthèse de phytoalexines stilbéniques, qui peut être induite par des stress biotiques (infections par les pathogènes) ou abiotiques, tels que les irradiations aux UV ou l'utilisation d'éliciteurs (Aziz *et al.* 2003). L'évaluation de la capacité de la vigne à produire des stilbènes est une méthode éprouvée, qui fournit une information fiable sur la résistance de la vigne contre *P. viticola*, *E. necator* et *B. cinerea* (Pezet *et al.* 2004; Gindro *et al.* 2006; Schnee *et al.* 2009). Le δ -viniférine est un des principaux stilbènes à être synthétisés dans des feuilles de vigne stressées, tandis que le pterostilbène est celui qui présente la plus forte toxicité contre les trois champignons précités. Par contre, dans les cépages sensibles, le resvératrol est glycosylé en un stilbène non toxique, la picéide. Dans les feuilles des cépages résistants, les formes oxydées du resvératrol et le pterostilbène, produits en forte concentration aux sites des infections, peuvent être analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Pezet *et al.* 2004).

Pour le mildiou de la vigne, la plupart des recherches liées aux processus d'infection et aux mécanismes de défense de la vigne se sont focalisées sur les infections

foliaires (Peressoti *et al.* 2011). Malgré de très intéressantes découvertes liées à l'épidémiologie, à la stratégie de lutte et à la prévision des risques (Bleyer *et al.* 2008; Viret *et al.* 2010), il existe peu de connaissances sur la sensibilité des grappes au mildiou. Certains résultats montrent bien une modification de la résistance des grappes au mildiou, à l'oïdium ou à la pourriture en fonction du développement des organes de la plante au cours de la saison, phénomène appelé résistance ontogénique ou résistance liée à l'âge (Keller *et al.* 2003; Kennelly *et al.* 2005; Gee *et al.* 2008), mais les mécanismes impliqués dans ce phénomène sont très peu connus, en particulier les changements de sensibilité des grappes à *Plasmopara viticola*.

Le but du présent travail est d'évaluer le rôle de l'anatomie stomatique et des stilbènes dans la résistance des grappes au mildiou durant le développement saisonnier sur quatre génotypes appartenant au genre *Vitis*.

Matériel et méthodes

Matériel biologique et conditions de culture

Des plans greffés de deux cépages de *Vitis vinifera* L., le Chasselas et le Merlot, ainsi que le Solaris résistant [Merzling x (Saperavi severneyi x Muscat ottonel)] et le très résistant n° 2091 (Gamaret x Bronner), obtenu dans le cadre du programme de sélection d'Agroscope Changins-Wädenswil (ACW), ont été plantés à Changins dans une parcelle expérimentale avec une ligne de chaque cépage conduite en Guyot. Durant deux années consécutives, six grappes de chaque génotype ont été récoltées à trois stades de développement BBCH (Hack *et al.* 1992). BBCH 53: inflorescences clairement visibles; BBCH 69: fin de floraison, tous les capuchons tombés; stade BBCH 75: baies de la taille de petit pois, en prélevant la première grappe depuis la base du rameau (une grappe par plante). Le mildiou utilisé pour les inoculations a été multiplié sur feuilles de Chasselas et les sporanges ont été aspirés à la surface des feuilles infectées. Vingt millilitres d'une suspension aqueuse de sporanges (4×10^5 sporanges/ml) ont été sprayés sur chaque grappe détachée, puis mise à incuber en chambre humide. Les grappes de contrôle ont été traitées de la même manière, en remplaçant la suspension de sporanges par de l'eau distillée.

Résumé Des grappes de quatre cépages, dont deux *Vitis vinifera* sensibles au mildiou, le Chasselas et le Merlot, et deux interspécifiques résistants, le Solaris et le 2091 (Gamaret x Bronner), ont été inoculées artificiellement avec du mildiou à trois différents stades de développement (BBCH 53, 69 et 75). Le développement de *Plasmopara viticola* a été suivi au microscope électronique à balayage et la production de phytoalexines stilbéniques a été analysée. Au stade préfloral (BBCH 53), trois types de stomates fonctionnels ont été observés et les zoospores ont pu germer sur les quatre cépages étudiés. Par contre, sur le Solaris et le 2091, l'induction de mécanismes de défense avec une forte production de stilbènes toxiques a permis de bloquer l'infection. Aux deux stades suivants, les stomates ne sont plus fonctionnels et aucune germination de zoospore n'a eu lieu. Cette observation est confirmée par l'absence d'induction de stilbènes dans les cépages résistants. Les modifications structurelles des stomates au cours du développement des baies constituent la phase initiale de la résistance ontogénique.

Microscopie électronique

Les échantillons ont été fixés par les vapeurs de tétraxyde d'osmium (2 % OsO₄, 3 % K₂Cr₂O₇) durant quatre heures en chambre humide, déshydratés par des bains d'acétone à concentrations croissantes, séchés avec du CO₂ selon la technique du point critique (*Critical Point Dryer*, Baltech) puis métallisés au platine. Les échantillons ont été observés au microscope à balayage Jeol JSM-6300F à 5 KV.

Analyse des stilbènes

Chaque grappe, infectée ou non, a été pesée et placée dans un tube en verre contenant 25 ml de méthanol. Les tubes ont ensuite été agités à 60 °C durant dix minutes, refroidis cinq minutes sur de la glace, puis séchés sous vide dans un Rotavapor Büchi. Les extraits secs ainsi obtenus ont été resolubilisés dans 1 ml de méthanol et 30 microlitres ont été analysés par chromatographie (HPLC) selon la méthode de Pezet *et al.* (2003). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol/mg}$ de poids frais (PF). >

Résultats et discussion

Différentes parties de grappes, infectées ou non, ont été observées au microscope électronique à balayage à trois différents stades phénologiques. Quel que soit le cépage, au stade BBCH 53 (inflorescences clairement visibles), des stomates fonctionnels sont présents sur les calyptres (capuchons), la rafle et les pédoncules des baies. Il existe trois types de morphologie sur la rafle et les pédoncules de chaque génotype de vigne observé: la majorité des stomates sont situés au niveau de la couche épidermique (fig.1A), tandis que d'autres sont

extrudés par rapport à celle-ci (fig.1B et 1C) ou invaginés dans l'épiderme (fig.1D). Sur les capuchons floraux, tous les stomates observés sont au même niveau que l'épiderme, quel que soit le cépage. Au stade BBCH 69 (fin de floraison, tous les capuchons tombés), la structure des stomates diffère sur les réceptacles, les pédicelles de baies et le rachis. Quelle que soit leur morphologie, ils sont entourés de nombreuses fissures (fig. 2A), de cellules de garde déstructurées (fig. 2B) et, dans certains cas, apparaît un collapse total des ouvertures stomatiques lié au développement de tissus épidermiques qui les recouvrent (fig.2C). Sur l'ovaire, un

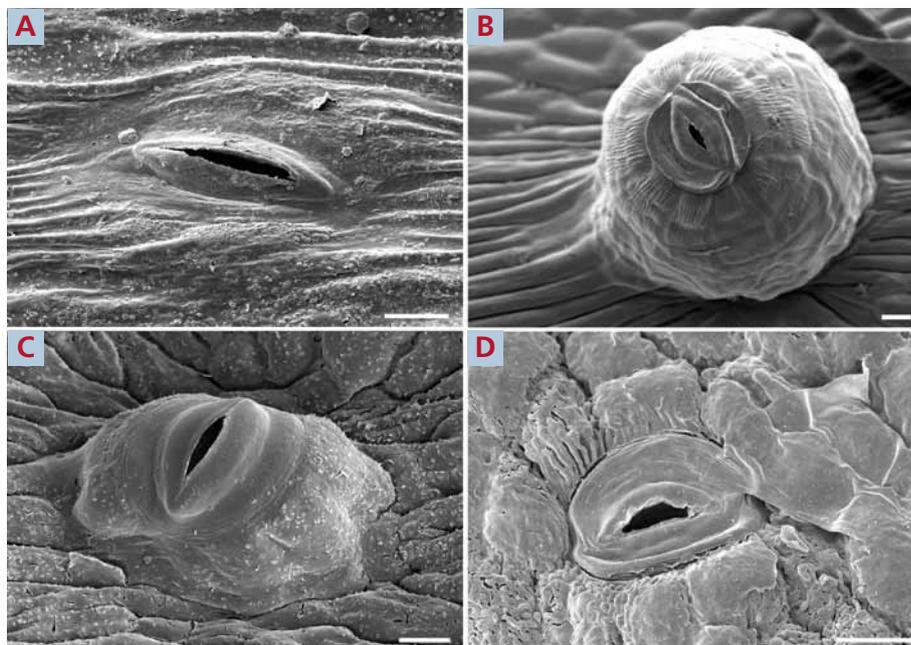


Figure 1 | Différents types de stomates présents sur le capuchon, les pédicelles de baies et le rachis de grappes des cépages Chasselas, Merlot, Solaris et 2091 au stade BBCH 53. A: stomate situé au même niveau que la couche de cellules épidermiques. B et C: stomates extrudés par rapport à la couche de cellules épidermiques. D: stomate invaginé dans l'épiderme. La barre d'échelle représente 10 micromètres.

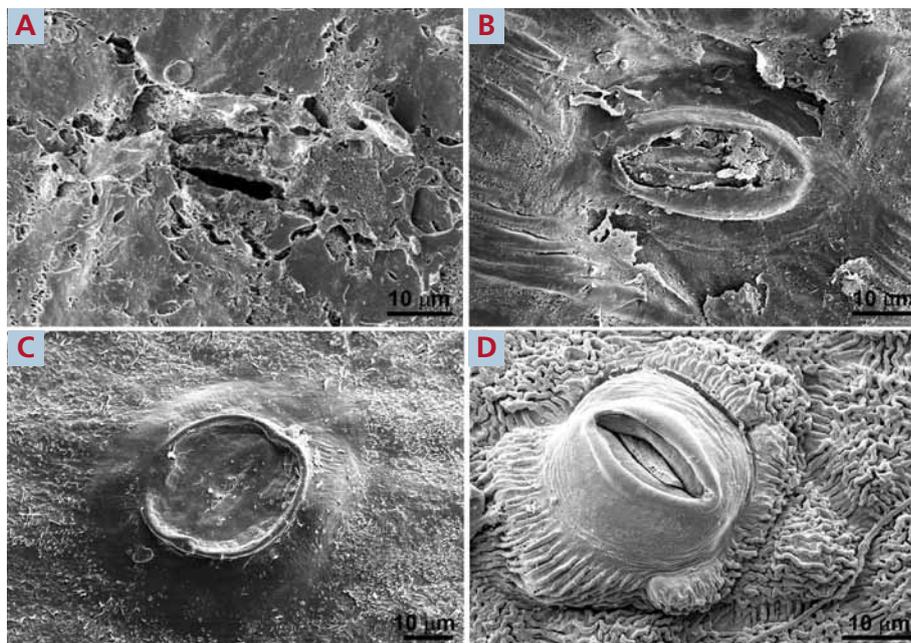


Figure 2 | Différents types de stomates présents sur le réceptacle, les pédicelles de baies et le rachis au stade BBCH 69. A: apparition de multiples fissures autour du stomate. B: stomates présentant des cellules de garde déstructurées. C: collapse total des ouvertures stomatiques dû au développement de tissus épidermiques les recouvrant. D: stomates bouchés par l'accumulation de matériel solide.

grand nombre de stomates semblent définitivement bouchés par l'accumulation d'un matériel solide à l'intérieur des ouvertures (fig.2D). Ces modifications structurales se maintiennent au stade BBCH 75, qui ne se différencie pas du précédent (BBCH 69). Les infections artificielles ont permis d'observer des zoospores enkystées sur tous les cépages testés au stade BBCH 53 (fig. 3A). Toutefois, l'émergence de sporangiophores à travers les stomates, cinq jours après l'infection et une abondante sporulation du mildiou (fig. 3B-3D), n'a été observée que sur les grappes de Chasselas et de Merlot. Sur les cépages résistants, le mildiou n'a pas émergé des stomates (fig.3E) et seules des micro-nécroses ponctuelles se sont formées cinq jours après infection (fig. 3F). Aucune infection et aucune sporulation n'ont pu être observées aux stades suivants sur les quatre cépages analysés.

Les stilbènes ont été quantifiés parallèlement aux observations microscopiques. Les résultats montrent que les grappes des cépages résistants réagissent rapidement à la présence de *P. viticola* en produisant une très forte concentration de stilbènes toxiques (Gindro *et al.* 2012). Par exemple, à un stade précoce de déve-

loppement des grappes (BBCH 53), un cépage très résistant comme le 2091 a accumulé plus de 150 $\mu\text{mol/mg}$ de δ -viniférine et plus de 40 $\mu\text{mol/mg}$ de pterostilbène aux sites de pénétration. Après infection, le cépage Solaris produit essentiellement de l' ϵ - et de la δ -viniférine, en concentrations légèrement plus faibles que le 2091, mais quasiment pas de pterostilbène qui est le stilbène le plus toxique pour le mildiou. Cela pourrait expliquer l'apparition au vignoble de sporulations tardives sur feuilles et grappes sur le Solaris en conditions de forte pression de mildiou. Chez les cépages sensibles, seules de fortes concentrations en picéide et en resvératrol, deux stilbènes pas ou peu toxiques pour le mildiou, sont induites. Les résultats montrent aussi que les infections ne sont possibles qu'à ce stade spécifiquement, car les stomates sont pleinement fonctionnels, quel que soit l'organe ou le génotype considéré. L'intégrité structurale des stomates est cruciale pour la réussite de l'enkystement et de la germination des zoospores de *P. viticola*. A la suite de la pénétration du tube germinatif, les mécanismes de défense naturelle, dont la synthèse des stilbènes, sont induits dans les cépages résistants. D'autres mécanismes biochimiques et moléculaires sont

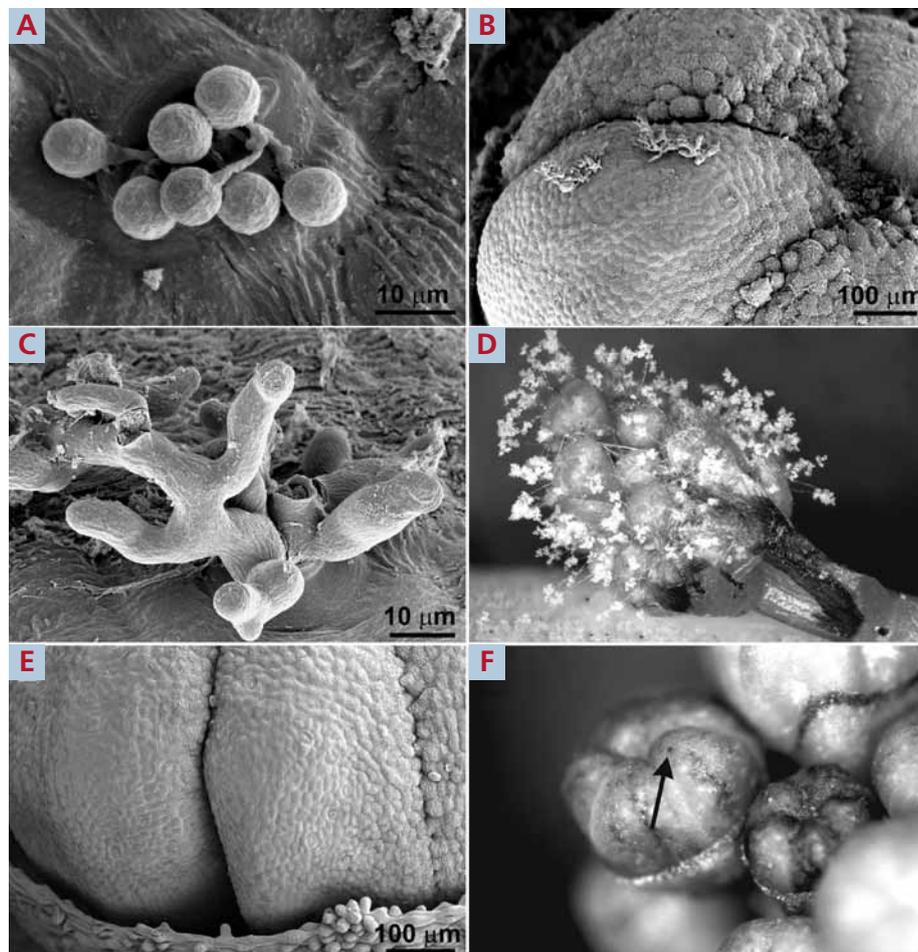


Figure 3 | Grappes de Chasselas, Merlot et 2091 infectées avec *Plasmopara viticola* au stade BBCH 53.

A: zoospores enkystées observées sur les quatre cépages.

B et C: émergence de sporangiophores au travers des ouvertures stomatiques sur Chasselas et Merlot quatre jours après inoculation.

D: fleurs de Chasselas présentant une abondante sporulation de mildiou quatre jours après inoculation.

E: calyptre du cépage 2091 sans émergence de sporangiophores quatre jours après inoculation du mildiou.

F: fleurs de 2091 avec formation de micro-nécroses (flèche) et absence de sporulation quatre jours après inoculation.

probablement impliqués dans la résistance de la vigne au mildiou. Cependant, dans ce travail, seule la quantification des stilbènes a été utilisée comme marqueur de la résistance de la vigne au mildiou.

Au cours du développement de la grappe, les stomates deviennent donc rapidement non fonctionnels, se transforment en structure de type lenticelle ou se bouchent. La conséquence est qu'aucune infection ne peut avoir lieu, ce qui stoppe l'induction des mécanismes. L'ensemble de ces résultats montre que l'infection directe des grappes par le mildiou ne peut se faire qu'à des stades très précoces de leur développement. L'origine de la résistance ontogénique des grappes n'a jamais été identifiée jusqu'à maintenant au niveau expérimental. Les résultats du présent travail montrent que les grappes sont sensibles à *P. viticola* du stade pré-floraison à la fin de la floraison. Durant cette période, les cépages manifestent différents niveaux de résistance, qui s'expliquent notamment par la production de stilbènes toxiques. Dès la fin de la floraison, ce sont les caractéristiques structurales qui semblent expliquer la résistance ontogénique au mildiou. Les symptômes tardifs de mildiou, tels que le rot brun, pourraient bien signifier que *P. viticola* se développe de manière systémique dans les tissus verts de la vigne à partir des vrilles, des feuilles ou des tiges, ainsi que le postulait déjà Gregory en 1915. Cette hypothèse est en cours d'expérimentation.

Remerciements

Nous tenons à remercier Eric Remolif pour toute l'aide apportée durant ces expérimentations ainsi que la Fondation Juana Da Vega (Espagne) pour le soutien financier du travail de post-doctorat du D^r Alonso-Villaverde.

Bibliographie

- Aziz A., Poinssot B., Daire X., Adrian M., Bezier A., Lambert B., Joubert J. M. & Pugin A., 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 1118–1128.
- Baggioolini M., 1952. Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue romande d'Agriculture et d'Arboriculture* **8**, 4–6.
- Blasi P., 2010. Analyse génétique comparée de la résistance à *Plasmopara viticola* chez les espèces apparentées à la vigne. Santé de la Vigne et Qualité du Vin (SVQV), INRA Colmar, vol. PhD, Université de Strasbourg, Strasbourg, 110.
- Bleyer G., Kassemeyer H. H., Krause R., Viret O. & Siegfried W., 2008. Forecasting model «VitiMeteo Plasmopara» for downy mildew, caused by *Plasmopara viticola*. *Gesunde Pflanzen* **60**, 91–100.
- Donald T. M., Pellerone F., Adam-Blondon A. F., Bouquet A., Thomas M. R. & Dry I. B., 2002. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine, *Theoretical and applied Genetics* **104**, 610–618.
- Gee C. T., Gadoury D. M. & Cadle-Davidson L., 2008. Ontogenic resistance to *Uncinula necator* varies by genotype and tissue type in a diverse collection of *Vitis* spp. *Plant Disease* **92**, 1067–1073.

Conclusions

- Au stade BBCH 53, l'enkystement et la germination des zoospores de mildiou se déroulent sur les grappes des quatre cépages étudiés, sensibles et résistants. Aux stades plus avancés, aucune germination n'est plus observée sur aucun cépage.
- Au stade BBCH 53, les cépages résistants produisent de fortes concentrations de stilbènes toxiques qui bloquent le développement du mildiou dans les grappes.
- Aux stades BBCH 69 et 75, aucune infection artificielle n'a été observée: l'infection des grappes ne serait donc possible qu'avant la floraison.
- Les stomates fonctionnels présents dans la grappe au stade BBCH 53 se transforment en lenticelles ou en structures non fonctionnelles dans les stades ultérieurs, empêchant ainsi toute pénétration du mildiou. Ces modifications structurelles expliquent l'apparition de la résistance ontogénique.
- Les infections plus tardives observées sur les grappes au vignoble, comme le rot brun, pourraient être la conséquence d'un développement systémique du mildiou dans les tissus verts de la plante. ■

- Gindro K., Alonso-Villaverde V., Voinesco F., Spring J.-L., Viret O. & Dubuis P.-H., 2012. Susceptibility to downy mildew in grape clusters. *Plant Physiology and Biochemistry* **52**, 140–146.
- Gindro K., Spring J.-L., Pezet R., Richter H. & Viret O., 2006. Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. *Vitis* **45**, 191–196.
- Gregory C. T., 1915. Studies on *Plasmopara viticola* (downy mildew of grapes). 1st International Congress of Viticulture, Geikie Press, San Francisco, California, 126–150.
- Hack H., Bleiholder H., Buhr L., Meier U., Schnock-Fricke U., Weber E. & Witzemberger A., 1992. Einheitliche Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen – Erweiterte BBCH-Skala, Allgemein. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **44**, 265–270.
- Keller M., Viret O. & Cole F. M., 2003. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology* **93**, 316–322.
- Kennelly M. M., Gadoury D. M., Wilcox W. F., Magarey P. A. & Seem R. C., 2005. Seasonal development of ontogenic resistance to downy mildew in grape berries and rachises. *Phytopathology* **95**, 1445–1452.
- Langcake P. & Lovell P. A., 1980. Light and electron microscopical studies of the infection of *Vitis* spp. by *Plasmopara viticola*, the downy mildew pathogen. *Vitis* **19**, 321–337.
- Pauquet J., Bouquet A., This P. & Adam-Blondon A. F., 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. *Theoretical and applied Genetics* **103**, 1201–1210.

Summary**Susceptibility of grape clusters to downy mildew**

Grape clusters of different genotypes, including *Vitis vinifera* cvs Chasselas and Merlot, and two interspecific grape varieties, Solaris and 2091 (Gamaret x Bronner) were inoculated with *Plasmopara viticola* at three developmental stages (BBCH 53, 69 and 75). Samples were examined by scanning electron microscopy and synthesis of stilbenic phytoalexins was measured. At BBCH 53, zoospores germination was observed on all tested cultivars and three types of functional stomata were set up. At this stage, resistant cultivars produced a significant accumulation of toxic stilbenes, which stopped the further development of downy mildew. At BBCH 69 and 75, stomata are no more functional and none of *P. viticola* infection was successful. This result is confirmed by the absence of stilbenes induction at these stages on resistant grapevine cultivars. The structural changes in stomata anatomy during cluster development induce the onset of ontogenic resistance.

Key words: downy mildew, cluster, grapevine, lenticels, ontogeny, resistance, stilbenes, stomata.

Zusammenfassung**Trauben Anfälligkeit auf Falschen Mehltau: neue mikroskopische und biochemische Erkenntnisse**

Trauben von vier Rebsorten, Chasselas, Merlot und zwei resistenten Sorten Solaris und 2091 (Gamaret x Bronner), wurden an drei verschiedene Entwicklungsstadien (BBCH 53, 69 und 75) künstlich mit dem falschem Mehltau infiziert. Die Entwicklung von *Plasmopara viticola* wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop verfolgt und die Phytoalexinproduktion analysiert. Vor der Blüte (BBCH 53) wurden drei Typen von funktionale Spaltöffnungen beobachtet und Zoosporen könnten auf alle vier Sorten keimen. Auf Solaris und 2091 wurden die Infektion durch Abwehrmechanismen besonders sehr hohe Phytoalexine Produktion gestoppt. In beiden späteren Entwicklungsstadien waren die Spaltöffnungen nicht mehr funktionell und keine gekeimte Zoosporen wurden beobachtet. Dieses Ergebnisse würde durch die fehlende Induktion von Stilbene in beide resistenten Sorten bestätigt. Die strukturellen Veränderungen in der Anatomie den Spaltöffnungen während der Traubenentwicklung stellen der Beginn der ontogenetische Resistenz dar.

Riassunto**Sensibilità dei grappoli alla peronospora: nuovi dati microscopici e biochimici**

Dei grappoli di quattro vitigni, di cui due *Vitis vinifera* sensibili alla peronospora, il Chasselas ed il Merlot e due interspecifici resistenti, il Solaris ed il 2091 (Gamaret x Bronner), sono stati inoculati artificialmente colla peronospora a tre diversi stadi di sviluppo (BBCH 53, 69 e 75). Lo sviluppo di *Plasmopara viticola* è stato seguito mediante microscopia elettronica a scansione ed è stata analizzata la produzione di fitoalessine stilbeniche. Allo stadio prefiorale (BBCH 53), tre tipi di stomi funzionali sono stati osservati e le zoospore sono state in grado di germinare sull'insieme dei quattro vitigni studiati. Per contro, su Solaris e 2091, l'induzione di meccanismi di difesa come una forte produzione di stilbeni tossici, hanno permesso di bloccare l'infezione. Nei successivi due stadi, gli stomi non sono più funzionali e inoltre non è stata osservata alcuna germinazione di zoospore. Questa osservazione è confermata dall'assenza d'induzione di stilbeni nei vitigni resistenti. Le modifiche strutturali dei stomi nel corso dello sviluppo degli acini rappresenta l'iniziazione della resistenza ontogenica.

- Peressotti E., Duchene E., Merdinoglu D. & Mestre P., 2011. A semi-automatic non-destructive method to quantify grapevine downy mildew sporulation. *Journal of microbiological Methods* **84**, 265–271.
- Pezet R., Gindro K., Viret O. & Spring J.-L., 2004. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and molecular Plant Pathology* **65**, 297–303.
- Pezet R., Perret C., Jean-Denis J. B., Tabacchi R., Gindro K. & Viret O., 2003. δ -viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 5488–5492.

- Schnee S., Spring J.-L., Viret O., Dubuis P.-H., Godard S. & Gindro K., 2009. Outils pour la sélection précoce de cépages résistants à l'oidium. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **41**, 87–93.
- Viret O., Dubuis P.-H., Bloesch B., Fabre A.-L. & Dupuis D., 2010. Dosage des fongicides adapté à la surface foliaire en viticulture: efficacité de la lutte. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **42**, 226–233.