



**HAL**  
open science

# Cartographie génétique et analyse de la résistance au mildiou et à l'oïdium de la vigne chez *Muscadinia Rotundifolia*

Sophie Blanc

► **To cite this version:**

Sophie Blanc. Cartographie génétique et analyse de la résistance au mildiou et à l'oïdium de la vigne chez *Muscadinia Rotundifolia*. Biologie végétale. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ088 . tel-00819905

**HAL Id: tel-00819905**

**<https://theses.hal.science/tel-00819905>**

Submitted on 2 May 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat de l'Université de Strasbourg  
Ecole doctorale des Sciences de la vie et de la Santé  
Spécialité : Agronomie

**Présentée par Sophie BLANC**

Pour l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université de Strasbourg



**CARTOGRAPHIE GENETIQUE ET ANALYSE DE  
LA RESISTANCE AU MILDIU ET A L'OÏDIUM  
DE LA VIGNE CHEZ *MUSCADINIA ROTUNDIFOLIA***

Présentée le 29 novembre 2012, à Colmar

**Membres du Jury :**

Charles-Eric DUREL	Directeur de Recherche	Rapporteur
Valérie GEFFROY	Chargée de Recherche	Rapporteur
Marie-France CORIO-COSTET	Directeur de Recherche	Examineur
Serge POTIER	Professeur	Examineur
Didier MERDINOGLU	Directeur de Recherche	Directeur de thèse
Pere MESTRE	Chargé de Recherche	Co-encadrant de thèse



---

Each time I think I've reached a limit there's a door, it opens,  
and the limit is gone.

- HERBERT NITSCH -

*Recordman du monde de plongée en apnée 2007, 2009 et 2010*





## **REMERCIEMENTS**

*Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres de mon jury, Charles-Eric Durel, Valérie Geffroy, Marie-France Corio-Costet et Serge Potier, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.*

*Je remercie également Anne-Françoise Adam-Blondon et Véronique Lefebvre d'avoir accompagné mon travail durant ces 3 ans, à travers la tenue de mes comités de thèse.*

*Merci à Didier Merdinoglu, mon directeur de thèse, de m'avoir encouragée et soutenue depuis le début dans la réalisation de ce projet. Merci de ta confiance, Didier, et merci de m'inciter à donner le meilleur de moi-même.*

*Un très grand merci à Pere Mestre pour son excellent co-encadrement, sa disponibilité et ses corrections pertinentes, tant sur l'article que sur le mémoire de thèse.*

*Merci à Aurélie Canaguier pour l'envoi au laboratoire de nouveaux marqueurs microsatellites destinés à compléter ma carte génétique, et à Marie-France Corio-Costet de nous avoir fourni les souches d'oïdium qui m'ont permis de réaliser les expériences de pathologie.*

*Je remercie également Jérôme Mutterer et Mathieu Erhardt pour leur accueil et leurs explications sur la microscopie électronique à balayage.*

*Merci à tous mes collègues de l'équipe Génétique et Amélioration de la Vigne de l'INRA de Colmar.*

*Particulièrement à : Frédérique, tu m'as donné le goût de la recherche en 2005 lors de mon stage de master2, je te dois beaucoup et j'admire tes qualités humaines et professionnelles ; Lucie, merci de m'avoir appris la rigueur en biologie moléculaire à mes débuts dans le laboratoire, nous ne t'oublions pas... ; Marie-Christine, ma coloc' de choc, ta gentillesse et ta présence réconfortante m'ont souvent aidé à garder le moral. Merci de ton soutien ; Marie-Annick, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée pendant cette thèse en pathologie avec l'oïdium ; Anne-Sophie pour la mise au point de la technique d'inoculation de l'oïdium, et Sabine pour le phénotypage mildiou ; Vincent et Pascale, merci pour votre aide avec la gestion du matériel végétal ;*

## REMERCIEMENTS

---

*Eric, merci pour ta disponibilité et ton aide précieuse en statistiques et sous R ; Christophe, Anne et Emilce pour les intéressantes et instructives discussions scientifiques ; Elisa, merci pour ton soutien et ta gentillesse, je te souhaite toute la réussite possible en Italie ; Jean-François, merci pour tous ces petits mots qui égayent le quotidien ! ; et simplement merci à celles et ceux qui m'ont aidé à un moment donné, d'une manière ou d'une autre, que ce soit matériellement ou par un encouragement ou une phrase gentille, ces attentions valent beaucoup à mes yeux et je m'en rappellerai longtemps.*

*Sophie, ton sourire, ta gentillesse et ton optimisme, malgré les épreuves que tu as endurées, sont un exemple. Merci de ton soutien !*

*Merci à mes collègues de galère, doctorants, post-doctorants et stagiaires. A commencer par : Claire et Damien, vous êtes de véritables amis, merci pour tout, d'avoir été là dans les hauts et surtout dans les bas... Claire, merci pour ta présence, et toutes ces petites attentions qui font que la vie, en doctorat ou pas, est un peu plus belle ! Je te souhaite plein de bonnes choses pour l'après-thèse, et promis je viendrai essayer Quorum ! Damien merci pour ton écoute, ta gentillesse et ton soutien, j'admire énormément ce que tu as réalisé pendant et surtout après ta thèse, et je suis sûre que ce n'est qu'un début ; merci également de m'avoir fait découvrir Mendeley ! Merci à Audrey, ma stagiaire, je n'aurais pas pu mieux tomber pour mon premier encadrement. Merci à Clémence G., pour son amitié et ses super cookies-remonte-moral ! Merci également à Clémence H., Lorène, Sylvaine, Caroline, Jean, Paule, Marjorie, Laureline, Aline, Maxime et Amal.*

*Merci également à Christine Lejeune de m'avoir permis de faire mes premiers pas d'enseignement en Licence à l'UHA.*

*Je remercie également le personnel des serres, sans l'aide de qui aucune expérience ne serait possible, et plus particulièrement Jacky, Guillaume, Denise et Christian.*

---

*Merci du fond du cœur à ma famille que j'aime plus que tout : ma maman, mon papa, ma mamie Odette, mon grand frère Pierre, et mes deux petits trésors Heidi et Axel 'Di-Chon' ! Votre soutien et votre amour sont le pilier de mon équilibre. Papi, j'aurais aimé*

## REMERCIEMENTS

---

*que tu sois présent... je pense à toi. Pierre, finalement nous soutenons nos thèses à un mois d'écart tout pile, ça c'est de la synchronisation... Si ce n'est que dans mon cas, je m'arrêterai à une seule thèse!*

*A mon Amour... Merci, pour tout. Pour tes corrections efficaces, pour ton soutien de chaque instant et ta présence sur les derniers mois. Quatre ans et demi après ta thèse, des aéroports et de l'amour plus qu'il n'en faut pour remplir la mer Baltique, un nouveau chapitre se clôt. En route pour le suivant !*

*Un énorme merci à mes amis, pour leur soutien précieux ! Je vous aime ! A Urely, plus qu'une amie, une sœur, merci de ta présence constante et de ton amitié sans faille dans les bons et les mauvais moments, malgré les kilomètres et quelles que soient les circonstances... et merci à nos batteries de téléphone ! ; à Loren, toujours présente dans mon coeur également depuis 12 ans... CACBU 4ever ! ; à Aurélie, toute jeune maman d'un adorable petit Hugo, finalement nous accouchons toutes les deux d'un 'bébé' quasiment au même moment ! ; à Elise, merci de ton soutien, d'avoir été là quand j'en ai eu besoin, et à Christophe, pour tous les bons moments et tes encouragements !*

*Et enfin, mais ce n'est négligeable... merci au sport ! Au tennis et à la danse!*

*REMERCIEMENTS*

---

**ABRÉVIATIONS**

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism
<b>ANOVA</b>	ANalysis Of Variance
<b>CC</b>	Coiled-Coil
<b>cM</b>	centiMorgan
<b>cv.</b>	cultivar
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (locution latine pour « et tous les autres »)
<b>ETI</b>	Effector-Triggered Immunity
<b>FISH</b>	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
<b>GL</b>	Groupe de liaison
<b>Ha</b>	Hectare
<b>hpi</b>	heure post-inoculation
<b>HR</b>	Hypersensitive Response
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IFT</b>	Indicateur de Fréquence des Traitements
<b>IM</b>	Interval Mapping
<b>ITS</b>	Internal Transcribed Spacer
<b>jpi</b>	jour post-inoculation
<b>KIN</b>	Domaine sérine/thréonine KINase
<b>LOD</b>	Logarithm (base 10) Of Odds
<b>LRR</b>	Leucine Rich Repeat
<b>mg</b>	milligramme
<b>MQM</b>	Multiple QTL Mapping

## ABREVIATIONS

---

<b>NBS</b>	Nucleotide Binding Site
<b>NCF</b>	Nested Chromosome Fusion
<b>ng</b>	nanogramme
<b>PAMP</b>	Pathogenesis-Associated Molecular Pattern
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptor
<b>PTI</b>	PAMP-Triggered Immunity
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidone
<b>QTL</b>	Quantitative Trait Locus
<b>R</b>	Résistance
<b>RLK</b>	Receptor-Like Kinase
<b>S</b>	Sensibilité
<b>s</b>	seconde
<b>SAM</b>	Sélection Assistée par Marqueurs
<b>SDN</b>	Stimulateur de Défense Naturelle
<b>SIM</b>	Simple Interval Mapping
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SSR</b>	Simple Sequence Repeat
<b>TIR</b>	Toll/Interleukin-1 Receptor
<b>URGV</b>	Unité de Recherche Génomique Végétale
<b>URGI</b>	Unité de Recherche Génomique Info
<b>µl</b>	Microlitre
<b>µl</b>	Micromolaire
<b>°C</b>	Degré Celsius

**TABLE DES MATIERES**

<b>Remerciements</b> .....	<b>V</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>IX</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>XI</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>3</b>
<b>Introduction bibliographique</b> .....	<b>9</b>
<b>I. La vigne</b> .....	<b>9</b>
I.1 Importances économique, culturelle et culturelle de la vigne et de la viticulture ....	9
I.2 Origine et domestication de la vigne commune <i>V. vinifera L.</i> .....	11
I.3 La muscadine, une vigne cultivée seulement aux Etats-Unis .....	12
I.4 Taxonomie et éléments de systématique.....	13
I.4.1 Une classification controversée .....	13
I.4.2 Différences entre Muscadinia et Vitis .....	14
<b>II. Les maladies de la vigne</b> .....	<b>18</b>
II.1 Les principaux bioagresseurs de la vigne.....	18
II.1.1 Les virus.....	18
II.1.2 Les bactéries .....	18
II.1.3 Les insectes .....	22
II.1.4 Les agents de maladies cryptogamiques.....	25
II.2 Le mildiou de la vigne.....	26
II.2.1 Cycle de vie et de développement .....	28
II.2.2 Symptômes .....	30
II.3 L'oïdium de la vigne .....	30
II.3.1 Cycle de vie et de développement .....	31
II.3.2 Symptômes .....	32
II.3.3 Biologie des populations d'oïdium .....	34
II.4 Les stratégies de lutte contre les maladies de la vigne .....	35
II.4.1 Les produits phytosanitaires.....	36
II.4.2 Les stimulateurs de défense naturelles .....	38
II.4.3 La lutte biologique .....	39
II.4.4 La création de variétés résistantes.....	40
<b>III. Les mécanismes moléculaires de défense des plantes contre les agents pathogènes</b> .....	<b>41</b>
III.1 Le système de défense des plantes .....	41
III.2 La résistance gène pour gène.....	44
III.3 Les principaux gènes de résistance aux mildious et oïdiums identifiés chez les plantes supérieures .....	46
III.3.1 Les gènes de résistance aux mildious .....	46
III.3.2 Les gènes de résistance aux oïdiums .....	49
<b>IV. La recherche de l'architecture génétique des caractères quantitatifs</b> .....	<b>50</b>
IV.1 Principe et intérêt de la recherche de QTL.....	50
IV.1.1 Origine de l'analyse QTL .....	51
IV.1.2 Outils d'une analyse QTL .....	52
a) Une descendance en ségrégation .....	52
b) Les marqueurs moléculaires et la construction d'une carte génétique.....	53
c) Le phénotypage .....	55
d) L'évaluation de l'héritabilité d'un caractère .....	55
e) La cartographie de QTL .....	56
<b>V. La sélection chez la vigne pour la création de variétés résistantes</b> .....	<b>58</b>
V.1 Pourquoi faire de la sélection pour la résistance chez la vigne ?.....	58
V.2 L'exploitation des sources naturelles de résistance chez la vigne en sélection.....	58



## TABLE DES MATIERES

V.3 Les facteurs de résistance au mildiou et à l'oïdium identifiés chez la vigne.....	61
V.3.1 Les facteurs de résistance au mildiou de la vigne .....	61
V.3.2 Les facteurs de résistance à l'oïdium de la vigne.....	66
V.4 La durabilité, un enjeu majeur dans la création de nouvelles variétés résistantes .....	69
<b>VI. Le contexte et les objectifs de la thèse.....</b>	<b>71</b>
<b>Partie A : Construction d'une carte génétique de <i>Muscadinia rotundifolia</i> ....</b>	<b>75</b>
<b>I. Contexte général.....</b>	<b>75</b>
I.1 Historique de la cartographie génétique chez la vigne .....	75
I.2 Contexte et objectifs de la construction d'une carte génétique chez la muscadine.....	75
<b>II. Matériel et Méthodes.....</b>	<b>76</b>
II.1 Matériel végétal : obtention de la population de cartographie .....	76
II.2 Extraction d'ADN.....	78
II.3 Amplification de microsatellites et détection du polymorphisme.....	78
II.3.1 Amorces microsatellites.....	78
II.3.2 Amplifications PCR .....	80
II.3.2 Séparation des produits PCR par électrophorèse capillaire .....	80
II.4 Construction de la carte génétique .....	81
II.5 Distorsion de ségrégation : test de $\chi^2$ .....	81
<b>III. Résultats.....</b>	<b>82</b>
III.1 Construction de la carte génétique de <i>M. rotundifolia</i> .....	82
III.1.1 Test du polymorphisme des marqueurs moléculaires.....	82
III.1.2 Carte génétique de <i>M. rotundifolia</i> .....	85
III.2 Comparaison des cartes génétiques de <i>V. vinifera</i> et <i>M. rotundifolia</i> .....	88
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>95</b>
IV.1 Comparaison générale des cartes génétiques établies pour 'Regale' et pour 'Fry' x 'Trayshed' .....	95
IV.2 Recombinaison et distorsion de ségrégation chez la muscadine.....	97
IV.3 Hétérogénéité de densité en marqueurs moléculaires .....	99
IV.4 Niveau de synténie entre <i>M. rotundifolia</i> et <i>V. vinifera</i> .....	100
IV.5 Cas du groupe de liaison 20 de <i>M. rotundifolia</i> .....	103
<b>V. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>109</b>
<b>Partie B: Détection de QTL de résistance au mildiou et à l'oïdium chez <i>Muscadinia rotundifolia</i>.....</b>	<b>113</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>113</b>
<b>II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>113</b>
II.1 Matériel végétal.....	113
II.2.1 Evaluation phénotypique de la résistance au mildiou .....	114
a) Matériel infectieux et entretien de la souche .....	114
b) Réalisation du phénotypage .....	114
II.2.2 Evaluation phénotypique de la résistance à l'oïdium.....	116
a) Matériel infectieux et entretien de la souche .....	116
b) Réalisation du phénotypage .....	119
II.3 Détection des QTL.....	121
<b>III. Résultats.....</b>	<b>122</b>
III.1 Analyse de la résistance au mildiou chez <i>M. rotundifolia</i> .....	122
III.1.1. Analyse des données phénotypiques .....	122
III.1.2. Analyse QTL.....	124
III.2 Analyse de la résistance à l'oïdium chez <i>M. rotundifolia</i> .....	126
III.2.1. Analyse des données phénotypiques .....	126
III.2.1. Analyse QTL.....	128
III.3 Analyse de la couleur des parties herbacées chez <i>M. rotundifolia</i> .....	134
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>136</b>
IV.1 Résistance au mildiou .....	136

## TABLE DES MATIERES

---

IV.2 Résistance à l'oïdium.....	137
IV.2 Couleur des parties herbacées.....	140
<b>V. Conclusion .....</b>	<b>142</b>
<b>Partie C : Etude de l'effet et du spectre d'action du QTL <i>Ren5</i>.....</b>	<b>145</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>145</b>
<b>II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>146</b>
II.1 Etude de l'effet de <i>Ren5</i> au niveau microscopique .....	146
II.2 Etude du spectre d'action de <i>Ren5</i> .....	146
<b>III. Résultats.....</b>	<b>147</b>
III.1 Etude l'effet de <i>Ren5</i> sur le développement d' <i>E. necator</i> .....	147
III.1.1 Distribution des données phénotypiques au locus <i>Ren5</i> .....	147
III.1.1 Analyse de l'effet de <i>Ren5</i> au niveau microscopique.....	150
III.2 Analyse de l'effet de <i>Ren5</i> face à d'autres souches d'oïdium .....	153
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>155</b>
IV.1 Mode d'action de <i>Ren5</i> .....	155
IV.2 Spectre d'action de <i>Ren5</i> .....	159
<b>V. Conclusion .....</b>	<b>160</b>
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>165</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>174</b>
<b><u>Annexe 1</u> : Comparaison macrosyténique des chromosomes des cartes génétiques de <i>M. rotundifolia</i> et <i>V. vinifera</i> .....</b>	<b>175</b>
<b><u>Annexe 2</u> : Blanc <i>et al.</i>, Theoretical and Applied Genetics (2012) .....</b>	<b>193</b>
<b><u>Annexe 3</u> : Liste des tableaux .....</b>	<b>207</b>
<b><u>Annexe 4</u> : Liste des figures.....</b>	<b>209</b>



INTRODUCTION  
GENERALE



### INTRODUCTION GENERALE

Au XXème siècle, et notamment après la seconde guerre mondiale, les pays développés ont cherché à démultiplier les niveaux de rendement, sous l'impulsion de l'introduction par les Etats-Unis de l'agriculture mécanisée intensive. La vigne *Vitis vinifera L.*, cultivée depuis l'antiquité, avait au fil du temps été sélectionnée par l'homme pour conserver un rendement et une qualité satisfaisant aux besoins locaux. Cependant, comme la plupart des espèces d'intérêt agronomique, elle n'a pas échappé à la généralisation de cette agriculture intensive. Afin de satisfaire les demandes croissantes de l'industrie et des consommateurs basées sur la qualité et le rendement, la viticulture a commencé à avoir recours à l'utilisation massive de produits phytosanitaires et de fertilisants, ce qui est encore aujourd'hui le cas.

Depuis quelques années, une prise de conscience a lieu sur les conséquences désastreuses de ces conduites agronomiques, aux niveaux tant économique que sanitaire pour l'homme et l'environnement. En effet, outre le coût annuel élevé de ces produits pour le viticulteur, ils ont un impact nocif sur la santé humaine et génèrent une pollution pour les sols et l'air. Des résidus de pesticides et de fongicides sont retrouvés dans les vins (Brun *et al.*, 2003; Čuš *et al.*, 2010). Les conséquences sont également d'ordre biologique puisque l'utilisation massive de ces produits conduit à l'apparition de nouvelles souches résistantes d'agents pathogènes, ce qui a un impact sur la biologie des populations de bioagresseurs (Gisi *et al.*, 2002, 2007; Wilcox *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007; Gisi & Sierotzki, 2008; Baudoin *et al.*, 2008; Furuya *et al.*, 2010). La vigne cultivée étant aujourd'hui exposée aux attaques d'un nombre élevé d'agents pathogènes, et dans un contexte où l'opinion publique est de plus en plus alertée sur les problèmes environnementaux (Grenelle de l'environnement, plan Ecophyto 2018), la recherche de méthodes de luttés alternatives contre les maladies devient impérieuse. Dans ce cadre, la création de nouvelles variétés de vigne intégrant des facteurs génétiques de résistance efficace et durable se place comme un objectif essentiel pour la viticulture moderne.

Pour arriver à exploiter au mieux ces résistances dans les programmes d'amélioration variétale, il est nécessaire d'en faire un inventaire le plus complet possible et de comprendre leur mode d'action. Il est en outre essentiel de prendre en compte le pathosystème dans son ensemble afin d'évaluer la durabilité des gènes de résistance dans le cadre de processus évolutifs qui impliquent à la fois l'hôte et l'agent pathogène.

Chez ce dernier, il est important de connaître la variabilité et la fitness des populations de bioagresseurs. Chez la plante, il est nécessaire d'explorer les sources naturelles de résistance pour déterminer le nombre, l'organisation et la nature moléculaire des gènes qui sont à l'origine de cette résistance. Cela implique également une bonne connaissance de l'organisation génomique des espèces naturellement résistantes, pour exploiter au mieux leurs facteurs de résistance en sélection.

Mon projet de thèse, réalisé au sein du Laboratoire Génétique et Amélioration de la Vigne de l'INRA de Colmar, s'inscrit dans un contexte de recherche de nouveaux facteurs génétiques de résistance aux maladies chez la vigne, dans le but de construire des variétés possédant une résistance durable. Les facteurs identifiés chez des espèces apparentées à la vigne cultivée, comme l'espèce américaine *Muscadinia rotundifolia*, sont d'un intérêt majeur pour la sélection de variétés résistantes. Cependant, lors du processus d'introgession, des difficultés pour obtenir des pépins viables dans les hybrides F1, ainsi que des anomalies phénotypiques dans les descendances en rétrocroisement, ont été constatées.

L'objectif de la thèse est de réaliser une analyse comparative des génomes de *V. vinifera* et *M. rotundifolia*, et d'identifier de nouveaux facteurs de résistance chez *M. rotundifolia*, utilisables à terme en sélection variétale. Ceci permettra tout d'abord de compléter la connaissance de ces déterminants génétiques, puis d'accélérer leur caractérisation fonctionnelle, et sans doute à terme de faciliter leur introgession dans un fond génétique cultivé sensible.

Mes travaux de thèse participent à la compréhension de cette question de recherche, en présentant la réalisation d'une carte génétique de *M. rotundifolia* cv. Regale, et l'analyse du niveau de résistance au mildiou et à l'oïdium d'une population issue de l'autofécondation de cette espèce, permettant de rechercher les facteurs qui sont à l'origine de cette résistance.

Ce manuscrit est organisé en quatre parties :

La première partie est une synthèse bibliographique qui a pour but d'introduire le contexte scientifique dans lequel a été réalisé ce travail.

Les trois parties suivantes sont consacrées à la présentation des principaux résultats expérimentaux que j'ai obtenus durant ma thèse, ainsi que des matériels et méthodes employés au cours de ces travaux.

Enfin, le manuscrit se termine par une discussion générale qui souligne les conclusions importantes de mon travail et aborde les perspectives envisageables.

Un article scientifique qui reprend une partie des résultats de la thèse, et qui a été accepté en juillet 2012 dans la revue *Theoretical and Applied Genetics*, est présenté en annexe.





INTRODUCTION  
BIBLIOGRAPHIQUE



## **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

### **I. La vigne**

#### **I.1 Importances économique, culturelle et culturelle de la vigne et de la viticulture**

De nos jours, la vigne est cultivée dans le monde entier, jouant un rôle central dans l'économie, la culture et l'histoire de nombreux pays. Elle est consommée en raisin de table et en jus, mais son exploitation principale repose sur l'industrie du vin. L'Union Européenne est le plus grand producteur de vin au monde et le plus grand exportateur mondial de produits viti-vinicoles. Le secteur rapporte ainsi à l'économie de l'Union environ 15 milliards d'euros par an ([www.ceev.be](http://www.ceev.be)).

En 2010, le vignoble français couvrait près de 865000 ha, soit près de 3% des terres arables (<http://www.franceagrimer.fr>). Présente sur environ 80 départements et 16 grands vignobles, la vigne se concentre cependant à plus de 95 % sur les 28 départements qui en comptent plus de 5000 ha. La vigne constitue une contribution significative à la richesse nationale. Hors subvention, la viticulture représentait 15,4% de la valeur de la production agricole en 2005, et 28 % de celle des produits végétaux (soit 8,7 milliards d'euros). En 2011, la France était le premier producteur mondial de vin, avec 51,1 millions d'hectolitres, et le troisième pays exportateur (<http://www.franceagrimer.fr>). En 2010, le chiffre d'affaires des exportations de vins et spiritueux en France s'élevait à 9,1 milliards d'euros (+ 18,3% par rapport à 2009), ce qui en faisait le premier secteur exportateur agro-alimentaire français ([www.fevs.com](http://www.fevs.com); Baudouin, 2012).

Cependant, l'importance du secteur viti-vinicole dans l'économie européenne et mondiale ne se mesure pas uniquement en termes financiers. Il contribue aussi de façon significative aux volets socio-économique, environnemental et culturel de la société : dans toutes les régions plantées de vignes, le secteur vitivinicole crée des centaines de milliers d'emplois. En France, près de 800 000 emplois dépendraient directement, indirectement ou de manière induite du vin (Baudouin, 2012). Ces emplois touchent des secteurs très variés, comme la construction et l'entretien d'engins viticoles et de matériel de chai, les verriers, les bouchonniers, les laboratoires d'analyse œnologique, les fabricants de produits phytosanitaires, les commerciaux, les prestataires de service pour la taille, les plantations et les différents travaux viticoles, les embouteilleurs, les transporteurs, le marketing ou encore la communication (Baudouin, 2012).

La vigne, plante pérenne, et les viticulteurs, ont également structuré et façonné le paysage au cours des siècles. Leur contribution à l'économie liée au tourisme et à la gastronomie est considérable.

Depuis les origines de la domestication de la vigne, les raisins et le vin représentent un élément important des sociétés occidentales, et sont intimement associés à leurs économies et à leurs cultures (Figure 1). La domestication de la vigne semble liée à la découverte du vin, même si savoir quel évènement a précédé l'autre reste incertain (This *et al.*, 2006). Le vin est depuis des milliers d'années considéré comme une boisson synonyme de fête et de convivialité, mais également comme une boisson divine chargée de signification mystique : les égyptiens ont attribué le don du vin à Osiris, les grecs à Dionysos et les romains à Bacchus (Mullins *et al.*, 1992). Dans les textes des évangiles chrétiens, le vin représente le sang de Jésus-Christ et il est fait de nombreuses références au vin dans l'Ancien Testament. Caton l'Ancien (234 -149 av. JC) écrit « Si l'on me demandait quel est le bien le plus précieux de la Terre, je répondrais c'est la vigne ».



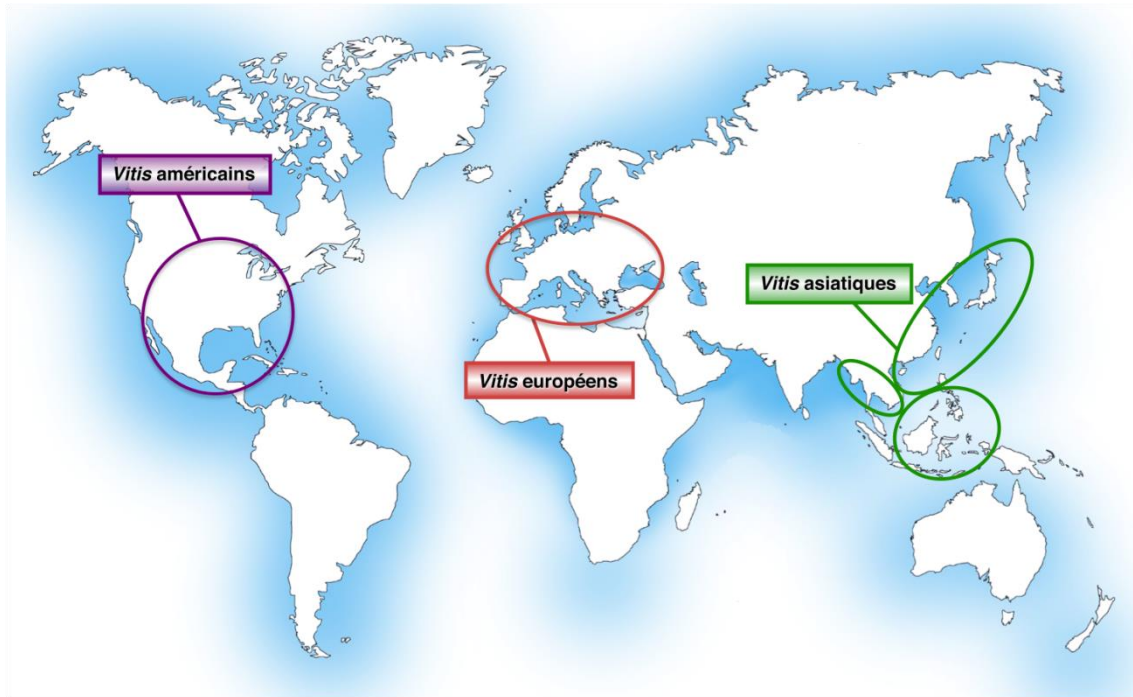
**Figure 1.** L'importance de la tradition vinicole pour l'Homme est soulignée par sa large représentation dans l'art, la religion et la littérature. Ces photos sont quelques exemples de la manière dont les artistes se sont inspirés de la culture du vin.

## **I.2 Origine et domestication de la vigne commune *V. vinifera* L.**

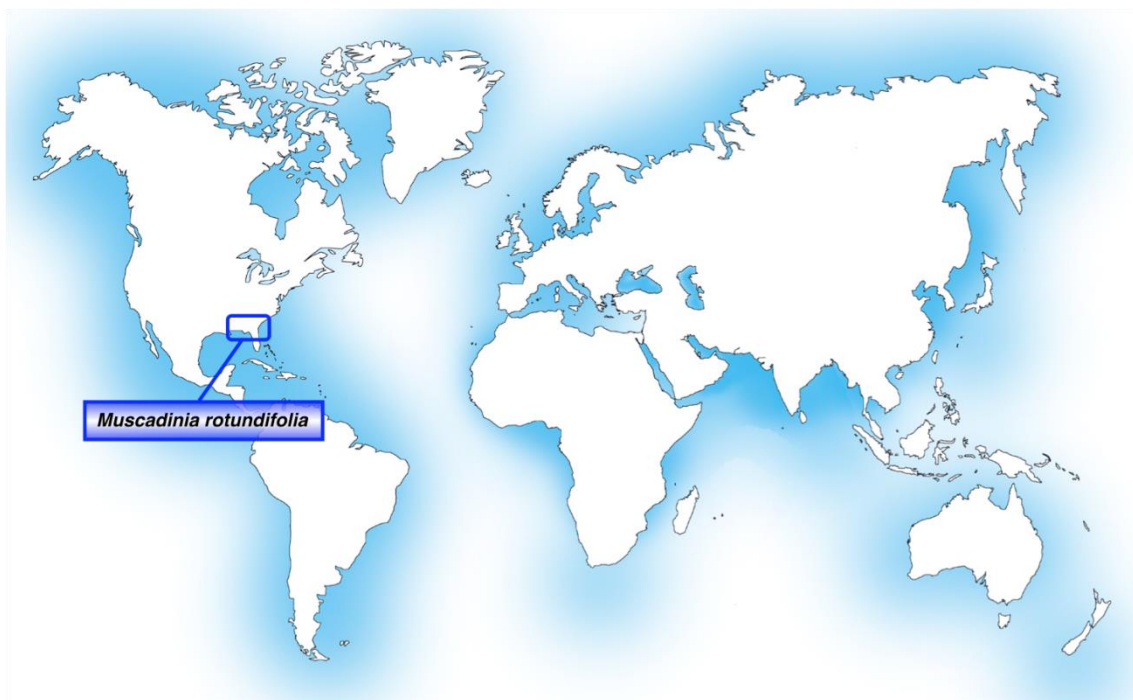
Les premières traces attestant de la présence de vigne apparaissent dans des fossiles vieux de soixante millions d'années. A la fin de l'ère tertiaire, la vigne sauvage devient très répandue dans tout l'hémisphère Nord. Au début du quaternaire, il y a environ 1,8 millions d'années, une série de glaciations successives a conduit à la fragmentation des populations de vignes dans différents refuges. Les périodes de réchauffement interglaciations ont permis à ces populations de se retrouver et de se croiser à nouveau. Ces variations se sont alternées quatre à cinq fois successivement sur un million d'années, ce qui a conduit à un important brassage génétique des populations de vigne (Fregoni, 1991).

La domestication de la vigne s'est vraisemblablement produite il y a 6 000 à 10 000 ans (Levadoux, 1956; Zohary & Hopf, 2000; McGovern, 2003), dans les régions du Caucase, entre la mer Noire et la mer Caspienne. Cette zone géographique serait le berceau majeur de la domestication de la vigne. Cependant, des travaux montrent que la péninsule ibérique pourrait être un autre lieu d'origine de la domestication de la vigne cultivée (Arroyo-García *et al.*, 2006). C'est ensuite avec la migration des populations humaines que la viticulture s'est dispersée et répandue, progressivement sur l'ensemble du pourtour méditerranéen, puis vers d'autres régions du globe.

L'ensemble du genre *Vitis* comprend aujourd'hui près de 60 espèces diploïdes ( $2n = 38$  chromosomes), se répartissant en trois groupes géographiques distincts (Figure 2a) : (i) les vignes américaines, qui sont composées d'une vingtaine d'espèces, parmi lesquelles *V. rupestris*, *V. riparia*, *V. labrusca* et *V. cinerea* ; (ii) les vignes asiatiques, qui comprennent une quinzaine d'espèces dont *V. amurensis* et *V. coignetiae* ; (iii) et la vigne européenne, qui n'est quant à elle constituée que d'une seule espèce, *V. vinifera* L.. Cette dernière espèce comprend un compartiment cultivé, *V. vinifera ssp. sativa*, ainsi que des vignes sauvages de type dioïque, *V. vinifera ssp. silvestris* ou lambrusque. Le compartiment cultivé de l'espèce, *V. vinifera ssp. sativa*, regroupe la très grande majorité des cépages communément cultivés en Europe et dans le monde. Il comprend plus de 6000 variétés ou cépages pour la plupart hermaphrodites, présentant des caractéristiques morphologiques et ampélographiques très différentes (Alleweldt & Possingham, 1988). Ce nombre est en perpétuelle évolution du fait de la disparition de certains cépages et de la création de nouvelles variétés.



**Figure 2a.** Localisation géographique des groupes de *Vitis* américains, asiatiques et européens.



**Figure 2b.** Localisation géographique de *Muscadinia rotundifolia*.

### **I.3 La muscadine, une vigne cultivée seulement aux Etats-Unis**

Au sein de la famille des *Vitaceae*, la section *Muscadinia*, communément désignée sous le nom de « muscadine », comprend des espèces apparentées à la vigne cultivée commune, donc généralement considérées comme des vignes. Seuls *Muscadinia* et *Vitis*

comportent des espèces cultivées pour la production de raisin, donc intéressantes pour l'homme du point de vue économique.

Cependant, l'aire d'extension de *Muscadinia* est strictement limitée au continent nord-américain, plus particulièrement au sud-est des Etats-Unis (Figure 2b). La muscadine joue depuis plusieurs siècles un rôle prépondérant dans l'histoire et la sociologie de cette région du globe (Olien, 1990). Les fruits sont consommés frais ou utilisés pour faire des jus, du vin ou des confitures.

La muscadine comprend seulement trois espèces : *M. rotundifolia*, *M. munsoniana* et *M. popenoei*. *M. rotundifolia* est la plus communément cultivée, si bien que lorsque le terme de muscadine est employé, il est généralement fait référence à cette espèce uniquement. Elle est cultivée dans cette aire géographique depuis plus de 400 ans (Olien, 1990), et est parfaitement adaptée au climat chaud et humide de cette région du globe. Les muscadines sauvages étaient au départ dioïques, et c'est seulement dans les années 1940 qu'ont été développés des cultivars hermaphrodites. *M. munsoniana* est un variant semi-tropical de *M. rotundifolia* originaire de Floride, et *M. popenoei* est une espèce tropicale originaire du sud du Mexique. Ces deux espèces ne sont pas réellement importantes sur le plan économique, mais elles constituent des sources possibles de variations génétiques pour les programmes d'amélioration variétale de la muscadine (Olien, 1990).

Se basant sur l'analyse de fossiles de Kirchheimer (Kirchheimer, 1939) et sur ses propres travaux, Alain Bouquet avança en 1983 que l'individualisation entre *Vitis* et *Muscadinia* remonterait soit aux premiers temps de l'expansion des angiospermes (tertiaire inférieur), soit serait une conséquence directe des glaciations du quaternaire. Dans ce dernier cas, il faudrait admettre que l'isolement géographique des *Muscadinia* se soit maintenu durant les périodes interglaciaires, empêchant ainsi tout échange génétique par introgression mutuelle avec les espèces du genre *Vitis* (Bouquet 1983).

### **I.4 Taxonomie et éléments de systématique**

#### ***I.4.1 Une classification controversée***

Dans la littérature, la famille des *Vitaceae* comprend 18 ou 19 genres selon la classification utilisée : en effet, une controverse divise les spécialistes sur le fait de



classer *Muscadinia* soit comme un genre à part entière au même titre que *Vitis*, soit comme un sous-genre au sein des *Vitis*.

Jusqu'aux années 1990, la nomenclature la plus communément admise était celle de Planchon (Planchon, 1887), qui a été utilisée par différents auteurs (Hedrick, 1908; Bailey, 1934; The Liberty Hyde Bailey Hortorium, 1976; Galet, 1988). Cette classification divise le genre *Vitis* L. en deux sous-genres (ou sections) : *Euvinis* Planch. et *Muscadinia* Planch. Sous cette classification, le nom usuel de la muscadine cultivée est *Vitis rotundifolia* Michx (Figure 3a).

Une classification alternative pour les *Vitis* et la muscadine a été publiée par Small (1913). Il n'a pas reconnu la classification en sous-genre de la muscadine par Planchon, préférant donner à *Muscadinia* le statut de genre à part entière. Basée sur des différences cytogénétiques, anatomiques, morphologiques et physiologiques entre les deux taxa, la classification de Small est une taxonomie reconnue par d'autres auteurs (Olmo, 1976; Bouquet, 1983; Mullins *et al.*, 1992).

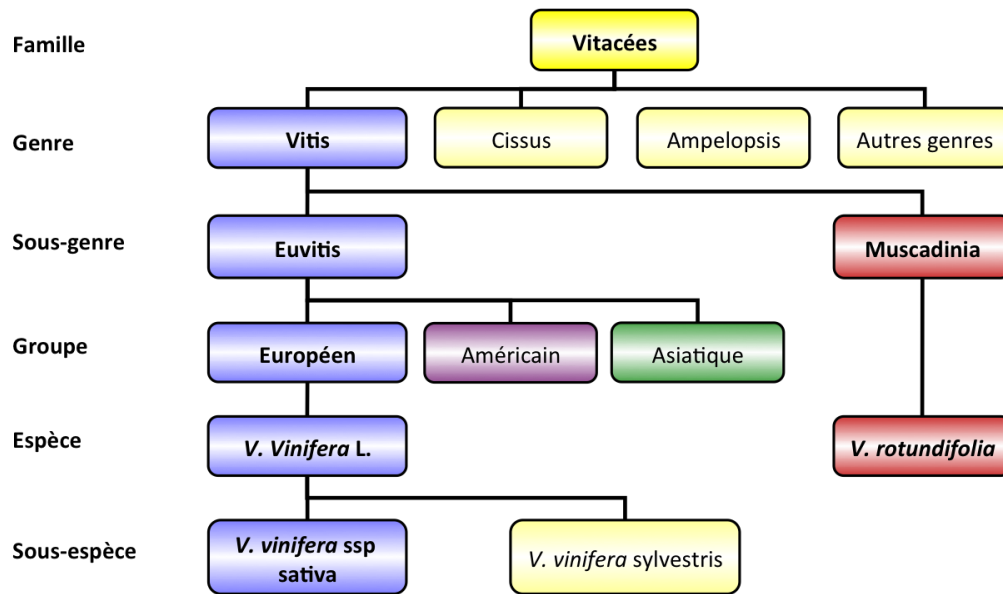
Cette dernière classification sera celle utilisée dans tout le manuscrit de thèse. Le nom usuel donné à la muscadine dans ce manuscrit sera donc *Muscadinia rotundifolia* (Figure 3b).

#### ***1.4.2 Différences entre Muscadinia et Vitis***

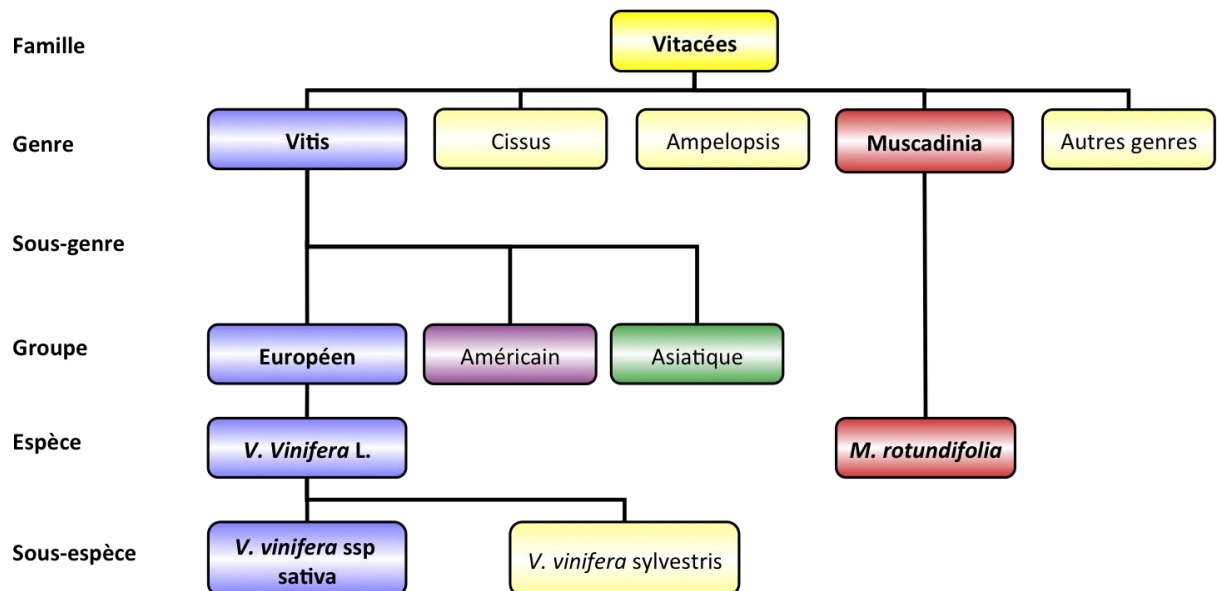
Les genres *Muscadinia* et *Vitis* diffèrent à plusieurs niveaux : leur nombre chromosomique, l'anatomie et la morphologie des parties herbacées et des fruits, l'aptitude des bourgeons latents à produire de nouvelles pousses et racines, les procédures requises pour la propagation clonale en pépinière, la compatibilité greffons/porte-greffes, et les caractéristiques physiques et chimiques des fruits et du jus (Olien, 1990; Goldy, 1992; Goldy & Onokpise, 2001).

Les principales différences entre les deux genres sont résumées dans le Tableau 1.

(a)



(b)



**Figure 3.** Classification de la muscadine (a) selon l'hypothèse de Planchon ; (b) selon l'hypothèse de Small, utilisée dans ce manuscrit.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

---

	<i>Vitis</i>	<i>Muscadinia</i>
Nombre chromosomique haploïde (n)	19	20
Nombres d'espèces identifiées	~ 60	3
Localisation géographique	Sur tous les continents	Limitée au sud-est des Etats-Unis
Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fruits à pellicule fine, nombreux fruits par grappe</li> <li>- Jus doux et léger en arômes, faible acidité</li> <li>- Pépins petits et ovoïdes</li> <li>- Pas de zone d'abscission entre fruit et rachis</li> <li>- Ecorce épaisse et dure</li> <li>- Bois de densité &lt;1</li> <li>- Moelle discontinue</li> <li>- Vrilles bi ou trifides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gros fruits à pellicule épaisse, peu de fruits par grappe</li> <li>- Jus intense en arômes, plus acide</li> <li>- Pépins gros et oblongs</li> <li>- Zone d'abscission entre fruit et rachis</li> <li>- Ecorce lisse et mince,</li> <li>- Bois de densité &gt;1</li> <li>- Moelle continue</li> <li>- Vrilles simples</li> </ul>
Multiplication	Bouturages de bois et herbacé efficaces	Bouturage de bois inefficace, et bouturage en vert peu efficace

**Tableau 1.** Principales différences entre les genres *Vitis* et *Muscadinia*.

Au niveau génétique tout d'abord, les espèces du genre *Muscadinia* possèdent 20 paires de chromosomes ( $2n=40$ ) alors que toutes les espèces du genre *Vitis* en comptent seulement 19 ( $2n=38$ ). Cette différence explique en partie la volonté des taxonomistes s'inscrivant dans la lignée de Small de classer *Vitis* et *Muscadinia* dans deux genres distincts. Plus généralement, au sein de la famille des *Vitaceae*, environ un tiers des genres environ présente un nombre chromosomique égal à 40 : les *Cissus* (espèces australiennes seulement), les *Ampelocissus*, les *Rhoicissus*, les *Parthenocissus*, les *Landukia*, les *Clematicissus* et les *Ampelopsis*.

L'hybridation entre *Vitis* et *Muscadinia* est compliquée. Il est difficile d'obtenir des pépins viables en F1, et des anomalies phénotypiques sont observées dans les descendance en rétrocroisement (Einset & Pratt 1975; Bouquet 1983; Goldy 1992).

Le sens du croisement a néanmoins une importance : *Muscadinia* se croise relativement bien avec certaines espèces de *Vitis*, quand elle est utilisée comme parent mâle, mais quand elle est employée comme parent femelle l'hybridation est beaucoup plus difficile. Les croisements entre les deux espèces se font donc préférentiellement dans le sens *Vitis* x *Muscadinia*.

Aux niveaux morphologique et anatomique, plusieurs différences séparent les deux genres (Tableau 1).

Les genres *Muscadinia* et *Vitis* sont incompatibles au greffage et diffèrent également au niveau des exigences pour la propagation en pépinière (Olien, 1990; Bouquet, 1983). Les *Vitis* produisent facilement des racines à partir de boutures de bois, ce qui n'est pas le cas des muscadines qui sont réfractaires à ce type de bouturage. La propagation végétative des muscadines requiert préférentiellement le bouturage en vert (ou herbacé) de jeunes tiges, mais ce dernier reste peu efficace.

## II. Les maladies de la vigne

### II.1 Les principaux bioagresseurs de la vigne

La plupart des maladies qui touchent la vigne, comme chez la plupart des plantes, résulte de l'interaction entre un hôte sensible et un organisme pathogène vivant. Ces agents causaux, appelés pathogènes biotiques, sont de natures très variées : principalement des virus, des bactéries, des insectes et des champignons.

#### II.1.1 Les virus

L'ArMV (Arabis mosaic virus) et le GFLV (Grapevine fanleaf virus), deux virus appartenant à la famille des népovirus, sont responsables de la maladie du court-noué de la vigne, la plus anciennement connue des maladies virales de la vigne. L'ArMV et le GFLV produisent les mêmes symptômes et sont transmis par des nématodes vecteurs, respectivement *Xiphinema diversicaudatum* et *Xiphinema index*. Le GFLV est le virus le plus dommageable et le plus fréquent en France. La maladie du court-noué se caractérise par des décolorations de couleur jaune à la surface des feuilles (Figure 4a), parfois accompagnées d'un développement anormal des nervures (Galet, 1977). Elle provoque aussi un développement anormal des entrenœuds, plus courts ou doubles (Figure 4a). Les vignes infectées perdent progressivement de la vigueur, ce qui conduit à la dégénérescence puis à la mort de la plante (Agrios, 1997), entraînant de lourdes pertes de rendement.

Le GLRaV (Grapevine leafroll-associated virus) provoque l'enroulement de la vigne. Les plantes atteintes sont sensiblement plus petites que la normale. Dès le début de l'été, les feuilles infectées prennent une couleur jaune ou rouge selon les cultivars, puis à la fin de l'été les feuilles s'enroulent de manière caractéristique (Figure 4b). La maturation des fruits est retardée et les grappes sont plus petites que la moyenne. La maladie provoque des dégâts chroniques sur la plante et des pertes de rendements, mais elle ne provoque pas la mort des plantes (Goheen, dans Pearson & Goheen, 1988).

#### II.1.2 Les bactéries

La maladie de Pierce est une maladie bactérienne particulièrement répandue dans les vignobles américains. Elle est causée par *Xylella fastidiosa*, bactérie transmise par des insectes vecteurs. Elle se développe dans les tissus du xylème, provoquant l'occlusion des vaisseaux et empêchant l'eau d'être drainée à travers la plante. Cette dernière est de moins en moins vigoureuse, ses feuilles commençant progressivement à s'assécher



**Figure 4.** Symptômes de maladies virales. (a) Le court-noué (photothèque INRA Colmar). Les parcelles infectées sont désignées par des flèches blanches ; (b) l'enroulement (Etienne Herrbach, INRA, Colmar).



(a)



(b)



(c)



**Figure 5.** Symptômes de maladies bactériennes. (a) La maladie de Pierce (©2000 The Regents of the University of California) ; (b) la Galle du Collet (omafra.gov.on.ca) ; (c) la flavescence dorée (inra.fr).

à partir des bords pour finalement tomber (Figure 5a) (Agrios, 1997). Cette maladie cause des pertes de rendement sévères, notamment dans le sud des Etats-Unis (Californie), en Amérique Centrale et dans les régions les plus au nord de l'Amérique du Sud, où la bactérie est présente et les insectes vecteurs abondants. La maladie de Pierce est le principal facteur limitant la production de *V. vinifera* dans les plaines côtières américaines (Goheen & Hopkins, dans Pearson & Goheen 1988).

La galle du collet, autre maladie bactérienne répandue chez plus de 600 espèces de dicotylédones dont la vigne, est causée chez la vigne par *Agrobacterium vitis*. Des lésions liées au gel peuvent provoquer les blessures nécessaires à l'infection. Des galles charnues, composées de tissus phloémiens désorganisés, sont produites en réponse à l'infection sur le bas des troncs essentiellement (Figure 5b) (Burr, dans Pearson & Goheen 1988). Il en résulte le dépérissement de la plante.

Une autre maladie de type bactérien répandue dans les vignobles européens est la flavescence dorée. Cette maladie dégénérative est causée par un phytoplasme, micro-organisme bactérien dépourvu de paroi cellulaire et localisé dans le tissu phloémien de la plante. Cet organisme est transmis au champ par un insecte vecteur, la Cicadelle de la vigne (*Scaphoideus titanus* Ball), dont la présence est étroitement associée aux épidémies de flavescence dorée (Figure 5c). La croissance des plantes infectées est globalement inhibée dès le printemps, les entrenœuds se raccourcissent et les plantes prennent un port pleureur. Mais les symptômes caractéristiques de la maladie apparaissent généralement en été. Les feuilles se durcissent, deviennent cassantes et tendent à se chevaucher. Elles prennent une coloration jaune dorée dans les cultivars à raisin blanc (Figure 5c) et rouge dans les cultivars à raisin noir, sur toutes les parties les plus exposées au soleil (Caudwell, dans Pearson & Goheen 1988). Les nervures prennent une teinte jaune crème à la fin de l'été, puis nécrosent généralement. Si les ceps sont atteints avant ou pendant la floraison, les inflorescences se dessèchent complètement. Après introduction au vignoble, la maladie se répand très rapidement (Caudwell, dans Pearson & Goheen 1988).



### **II.1.3 Les insectes**

L'insecte le plus tristement célèbre pour ses dommages causés à la vigne est le puceron responsable de la maladie du phylloxera (Figure 6a). En 1860, les vignobles de la vallée du Rhône se sont vus affectés par une maladie causant prématurément un flétrissement, puis la mort d'un très grand nombre de plantes. Les dommages étaient dus à un insecte hémiptère aphidien des racines connu sous le nom de *Daktulosphaira vitifoliae* Fitch., et ont conduit en peu de temps à une chute drastique de la production de vin. Ce puceron, originaire des Etats-Unis, a été accidentellement introduit en France avec l'importation de vignes américaines. Les *Vitis* européens, qui avaient vraisemblablement évolué en l'absence du Phylloxera, ont donc montré une grande sensibilité face à l'attaque de ce nouveau ravageur, tandis que les vignes américaines indigènes ont développé une résistance naturelle efficace.

Les espèces américaines et européennes sont, malgré leurs propriétés ampélographiques et organoleptiques différentes, suffisamment proches pour permettre l'hybridation et le greffage interspécifique. Cette caractéristique a sans doute sauvé les variétés européennes de l'extinction (Robinson, 2007). Le greffage des variétés de vigne européennes classiques sur des porte-greffes américains a permis le renouveau de l'industrie du vin en Europe. Durant les années 1870, de grandes quantités de porte-greffes ont ainsi été transportées entre le Vieux et le Nouveau Continent, ce qui a favorisé l'expansion géographique de la vigne, mais également l'introduction de nouveaux parasites jusqu'alors inconnus en Europe, comme le mildiou de la vigne.

Des acariens peuvent induire des maladies chez la vigne, telles que l'érinose et l'acariose. Les piqûres d'alimentation de l'acarien de l'érinose sur les feuilles de vigne se traduisent par une réaction du parenchyme : des boursouflures sur la face supérieure et des dépressions tapissées d'un feutrage blanc sur la face inférieure apparaissent. L'acariose des feuilles est quant à elle due aux piqûres de divers acariens, dont le petit acarien jaune et le phytopte de l'acariose de la vigne. Cette affection, beaucoup plus grave que l'érinose, se reconnaît à la présence d'entre-nœuds courts, à l'aspect buissonnant des pousses, à la crispation des feuilles et à des modifications de leur coloration (Figure 6b) (Coutin, 2002).

(a)



(b)



(c)



**Figure 6.** Symptômes de maladies générées par des insectes. (a) Le phylloxera (Etienne Herrbach, INRA, Colmar) ; (b) l'acarose (inra.fr) ; (c) les vers de la grappe (Gérard Hommay, INRA, Colmar).

(a)



(b)



**Figure 7.** Symptômes de maladies cryptogamiques. (a) La pourriture grise (photothèque INRA Colmar) ; (b) le black rot (Christophe Schneider, INRA, Colmar).

Des larves de lépidoptères (papillons) peuvent également ravager la vigne, elles sont appelées « vers de la grappe ». Cette dénomination recouvre principalement deux espèces qui infectent la vigne : la *Cochylis* (*Eupoecilia ambiguella*) et l'*Eudemis* (*Lobesia botrana*). Les larves pénètrent dans les baies et les vident, ne laissant que la peau et les pépins (Figure 6c), provoquant ainsi une perte de récolte lorsque les populations sont importantes. Les larves de lépidoptères favorisent également le risque d'apparition et de développement de la pourriture grise (voir chapitre II.1.4, les agents de maladies cryptogamiques), principalement lorsque les conditions climatiques sont humides, ainsi qu'un risque de pourriture acide (provoqué par les larves de drosophiles) favorisé par les blessures occasionnées par les vers dans les zones sensibles (Blanc 2003).

### **II.1.4 Les agents de maladies cryptogamiques**

Les maladies qui touchent les organes herbacés des plantes et sont causées par un champignon ou tout autre organisme filamenteux sont appelées « maladies cryptogamiques ». Quand elles touchent les parties lignifiées de la plante, on les appelle « maladies du bois », bien que ces pathologies puissent également affecter les parties herbacées. Dans cette catégorie de maladies se trouvent notamment l'esca, le black dead arm ou l'eutypiose, cette dernière étant la plus destructrice pour les cépages commercialisés à l'heure actuelle (Carter, dans Pearson & Goheen, 1988). Ces maladies sont encore mal connues et assez difficiles à étudier, car elles font pour la plupart intervenir des complexes regroupant plusieurs agents pathogènes, qu'il faut dans un premier temps arriver à isoler.

Les champignons ou organismes filamenteux qui infectent uniquement les baies et les parties herbacées de la vigne (feuilles, tiges,..), induisent des maladies dites « cryptogamiques du feuillage », dont font partie la pourriture grise, le black rot, le mildiou et l'oïdium.

La pourriture grise est provoquée par l'ascomycète *Botrytis cinerea* Pers.Fr., qui est un organisme nécrotrophe capable de pénétrer dans les tissus blessés de l'hôte. Sa colonisation entraîne la mort progressive des tissus infectés, sur lesquels la pourriture grise peut se nourrir, croître et se reproduire. En conditions humides et froides, le champignon infeste les bourgeons et les grappes, formant une masse cotonneuse de conidies grises (Figure 7a). Les tissus infectés deviennent ainsi plus souples et aqueux,

jusqu'à ce qu'ils flétrissent, pourrissent et meurent. Ce champignon peut passer l'hiver dans le sol, grâce à la production de structures de résistance appelées « sclérotés », qui peuvent germer à nouveau au printemps et produire des conidiophores. La pourriture grise peut ainsi engendrer de sévères pertes de rendement. Cependant, ce même champignon est aussi l'agent responsable de ce que l'on appelle la "pourriture noble", qui se développe quand les pieds de vigne sont exposés à des conditions plus sèches. Dans ce cas, le pathogène assèche les baies, et les grappes deviennent en partie passerillées. Ce processus de déshydratation partielle induit une forte accumulation de sucre dans les raisins, ce qui est généralement exploité par les viticulteurs pour produire des vins d'apéritif ou de dessert très sucrés (Rieger, 2006).

L'agent responsable du black rot est le champignon ascomycète *Guignardia bidwellii*. Les infections primaires attaquent généralement les jeunes feuilles et les pédicelles des fruits, sous la forme de petites taches nécrotiques rouges qui par la suite s'élargissent, jusqu'à recouvrir parfois la totalité de la surface de la feuille. A mesure que la maladie progresse, les taches brunissent et leurs contours deviennent noirs (Figure 7b). A la surface, des structures reproductrices appelées « pycnides » sont rapidement formées, et leur dispersion par le vent et les pluies favorise les infections secondaires, qui peuvent apparaître sur les baies et les tiges également. Sur les baies, le black rot forme des zones brunes entourées d'une ligne noire avec une région centrale plate, ou formant une légère dépression. Les pycnides sont initialement produites au centre du spot et, si aucun contrôle phytosanitaire n'est exercé, leur nombre continuera d'augmenter jusqu'à ce que les baies rétrécissent et pourrissent (Agrios, 1997).

Les deux maladies cryptogamiques qui touchent le plus sévèrement les vignobles à l'heure actuelle sont le mildiou et l'oïdium. Dans ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à ces deux maladies, auxquelles seront consacrés les deux prochains paragraphes de ce chapitre portant sur les maladies de la vigne.

### **II.2 Le mildiou de la vigne**

Originaire du continent américain, le mildiou a été introduit accidentellement en Europe en 1878, probablement quand les porte-greffes américains résistants au phylloxera de la vigne ont été importés pour greffer les variétés européennes (Viennot-Bourgin, 1949). L'année suivante, des symptômes ont commencé à être observés en France et en Italie.



Dès lors, la maladie s'est répandue comme une trainée de poudre dans toute l'Europe, gagnant également la côte africaine (Galet, 1977). Dès les toutes premières années du XXème siècle, la présence de mildiou a été rapportée dans des régions équatoriales et tropicales comme l'Amérique du sud et l'Australie, d'où l'utilisation du terme d'épidémie mondiale (Galet, 1977).

L'agent responsable de la maladie est *Plasmopara viticola* (Berk. et M.A. Curtis) Berl. et De Toni, un parasite biotrophe obligatoire appartenant aux oomycètes. Les oomycètes forment un groupe phylogénétiquement distinct parmi les microorganismes eucaryotes. Bien qu'ils soient, à l'instar des autres organismes de type champignon, traditionnellement étudiés par les mycologistes, ils appartiennent en réalité au règne des *Stramenopila*, phylogénétiquement plus proche des algues brunes que des champignons. La paroi cellulaire des oomycètes est principalement composée de glucanes et de polymères de type cellulose avec un faible pourcentage de chitine. A l'inverse, la chitine est le composant essentiel de la paroi cellulaire des champignons. De plus, la composition en stérols de la membrane cellulaire des oomycètes est davantage similaire à celle d'une plante. Néanmoins ils partagent avec les champignons plusieurs aspects de leur mode de vie, tels que la croissance apicale des hyphes, l'organotrophie et l'absence de pigments photosynthétiques.

Comme les autres mildious (tournesol, pomme de terre), *P. viticola* appartient aux Péronosporales, un ordre majeur d'oomycètes qui inclut des parasites parmi les plus dévastateurs pour les plantes et les animaux, comme ceux appartenant aux genres *Phytophthora*, *Peronospora*, *Bremia* ou *Albugo* (Kamoun, 2003).

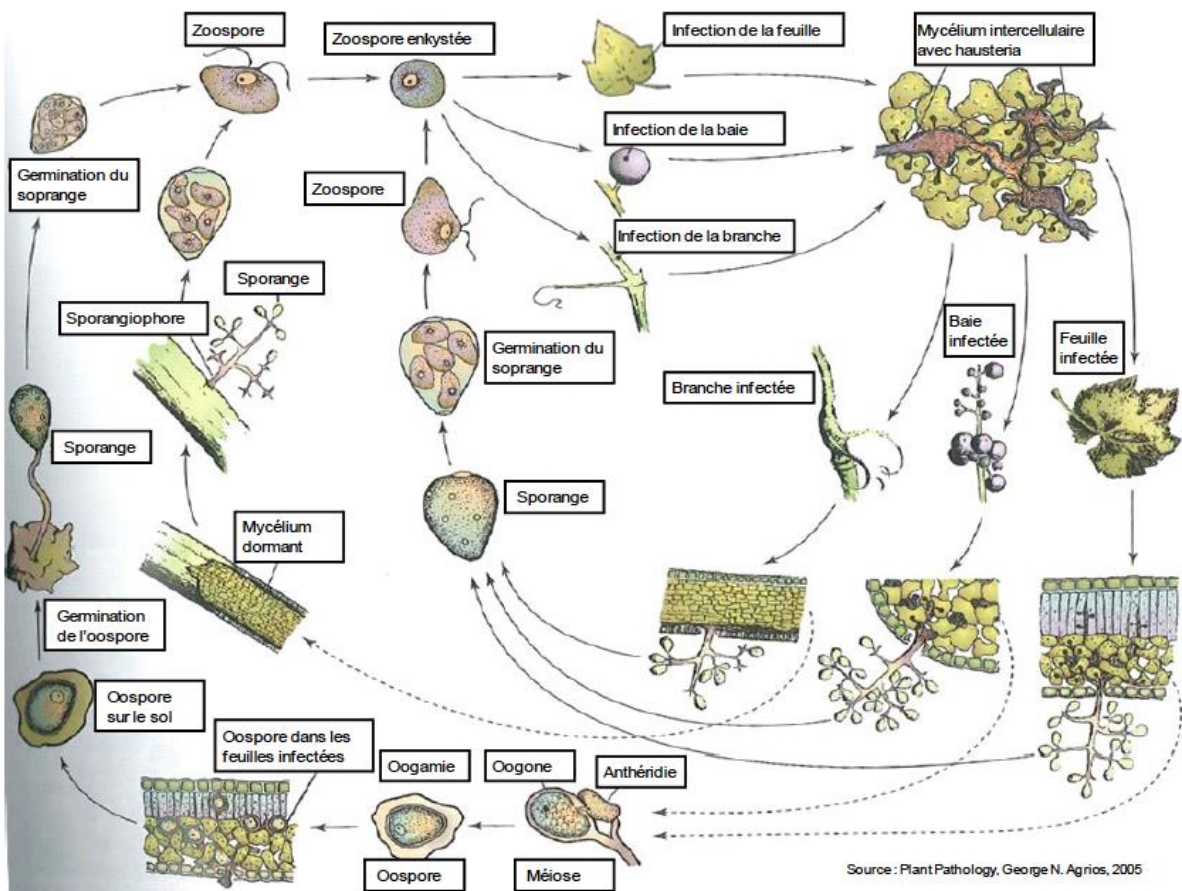
Les mildious sont spécialisés pour ne coloniser qu'une gamme réduite d'hôtes et peuvent être des biotrophes « obligatoires », comme *P. viticola*, ou des « hémibiotrophes » comme le mildiou de la tomate et de la pomme de terre *Phytophthora infestans*. Les organismes hémibiotrophes sont biotrophes dans leur phase parasite initiale, puis passent ensuite en mode de vie nécrotique en tuant les tissus hôtes pour se répandre (Deacon, 2006).

### ***II.2.1 Cycle de vie et de développement***

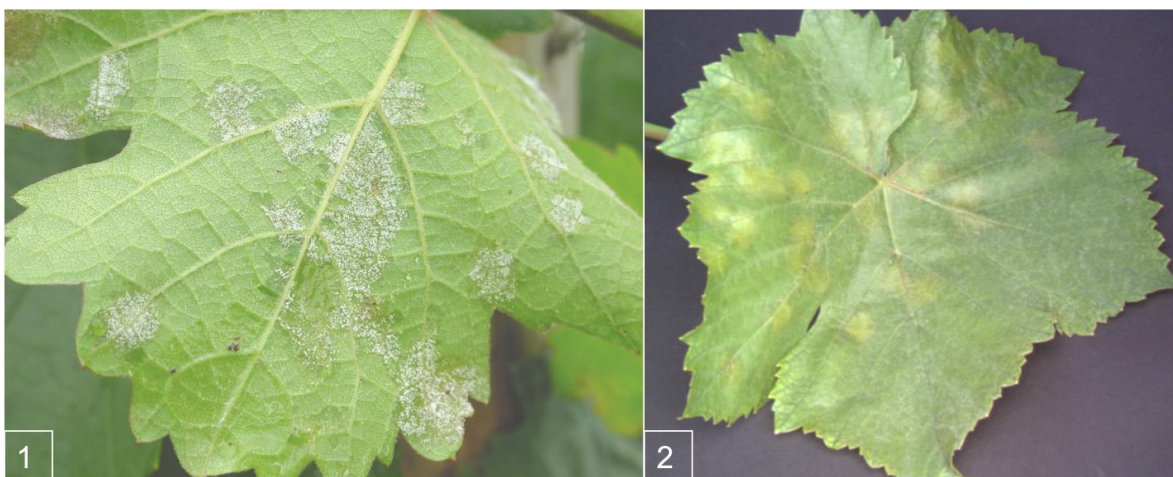
*P. viticola* s'attaque à tous les tissus herbacés de la vigne, feuilles, vrilles ou bourgeons, ainsi qu'aux grappes. Il provoque des défoliations, ainsi que le brunissement et l'assèchement des baies et des tiges. La sensibilité des plantes au mildiou dépend chaque année de l'interaction de plusieurs variables plus ou moins favorables à l'agent pathogène, telles que le climat et l'état physiologique de la plante hôte.

En l'absence de traitement et dans des conditions climatiques favorables, le mildiou de la vigne peut dévaster jusqu'à 75% de la récolte de la saison. De plus l'affaiblissement des bourgeons et la production grappes disgracieuses provoquent des pertes économiques importantes (Agrios, 1997).

*P. viticola* est un agent pathogène hétérothallique diploïde (Wong *et al.*, 2001), et son cycle de vie comprend une phase sexuée et une phase asexuée (Figure 8a). La phase asexuée conduit à la production de spores nécessaires aux infections secondaires et à la dispersion de l'agent pathogène sur une courte distance, tandis que la phase sexuée produit des oospores quiescentes et résistantes au froid permettant le passage de l'hiver et les infections primaires (Galet, 1977). Les oospores latentes dans le sol constituent la première source d'inoculum pour la saison suivante. Elles germent dans l'eau au printemps dès que la température atteint 11°C (Lafon & Clerjeau, dans Pearson & Goheen, 1988). Elles produisent un tube germinatif à travers lequel le noyau de l'oospore migre pour donner un seul macrosporange terminal, puis des zoospores flagellées se forment par division mitotiques et sont relâchées (Spencer, 1981). Ces zoospores, une fois à proximité d'un stomate, perdent leur flagelle, s'enkystent et sécrètent une matrice extracellulaire glycoprotéique pour s'attacher à la surface de la plante (Grenville-Briggs & Van West, 2005). Un tube germinatif est émis, qui pénètre par le stomate dans la chambre sous-stomatique et devient en gonflant une vésicule, de laquelle va émerger un hyphe primaire dans les tissus du mésophylle de la plante. A mesure que l'hyphe continue de se développer, il devient branché et forme par endroits des structures intracellulaires spécialisées appelées « haustoria », qui sont des organes singuliers spécifiques aux agents pathogènes biotrophes (Latijnhouwers *et al.*, 2003). Les haustoria permettent l'absorption des nutriments ainsi que la croissance du mycélium dans le mésophylle, et constituent donc la première étape réelle de biotrophie pour l'agent pathogène.



**Figure 8a.** Cycle de vie de *Plasmopara viticola*, l'agent causal du mildiou de la vigne (Agrios, 2005).



**Figure 8b.** Symptômes du mildiou de la vigne sur feuilles (phototothèque INRA Colmar).  
(1) Sur la face abaxiale ou inférieure ; (2) sur la face adaxiale ou supérieure.



La manifestation extérieure du parasite correspond à la formation de sporangiophores en forme d'arbres qui émergent des stomates en petits groupes, ce qui définit l'événement de sporulation. Quand elle survient sur les feuilles, la sporulation apparaît sur la face abaxiale ou inférieure (Figure 8b1). Les sporangiophores de *P. viticola* forment des branches, qui se ramifient et portent les sporanges. Ces derniers libèrent les zoospores biflagellées qui seront responsables de la propagation de la maladie lors des infections secondaires. Ces événements décrivent la phase asexuée de la reproduction de l'agent pathogène. Les oospores sont quant à elles produites lors du cycle sexué, lorsque les oogonies sont fécondées par les anthéridies du type sexuel opposé (Galet, 1977; Wong *et al.*, 2001). Les oospores restent alors dans le mésophylle de la feuille et passent l'hiver dans le sol et les débris de tissus foliaires consécutifs à la défoliation automnale. La température optimale pour la prolifération de l'agent pathogène est de 20 à 25°C environ (Lafon & Clerjeau, dans Pearson & Goheen, 1988). De plus, des pluies ou une forte humidité favorisent considérablement le développement du mildiou.

### **II.2.2 Symptômes**

La première preuve macroscopique de la présence de mildiou dans un vignoble est l'apparition de tâches jaune pâle et irrégulières (tâches d'huile) grossissant sur la face supérieure, ou adaxiale, des feuilles (Figure 8b2). A mesure que la colonisation interne du mycélium avance, le développement de coussins blanc cotonneux sur la face inférieure en correspondance avec les tâches d'huile devient plus important (Figure 8b1). Dans les infections avancées ces symptômes sont accompagnés de tissus morts bruns. Parfois, particulièrement vers l'automne, les feuilles présentent une apparence « en mosaïque » (Galet, 1977; Agrios, 1997). Le mildiou peut également pousser sur d'autres parties vertes de la plante, mais l'infection des feuilles constitue la source majeure d'inoculum pour l'infection des baies et pour le passage hivernal. Les jeunes baies sont les plus sensibles et le sont de moins en moins à mesure qu'elles mûrissent.

### **II.3 L'oïdium de la vigne**

Les oïdiums appartiennent à l'ordre des Erysiphales. Ce sont des ascomycètes et des parasites biotrophes obligatoires, qui affectent toutes sortes de végétaux. Les oïdiums touchent de nombreuses plantes supérieures, parmi lesquelles les céréales, le pois, le fraisier, le pommier, le marronnier, le concombre, la tomate, le chêne, et la vigne.

Chez la vigne, l'agent responsable de la maladie est l'ascomycète *Erysiphe necator* (Schwein.) et Burr. A l'instar du mildiou, l'oïdium a été introduit involontairement en Europe en provenance des Etats-Unis, lors de l'importation de boutures de vigne américaines. La maladie observée pour la première fois en Europe en 1845 (Galet, 1977).

### **II.3.1 Cycle de vie et de développement**

*E. necator* colonise la surface de tous les organes verts de la vigne, notamment la face supérieure des feuilles, et se propage sur les baies.

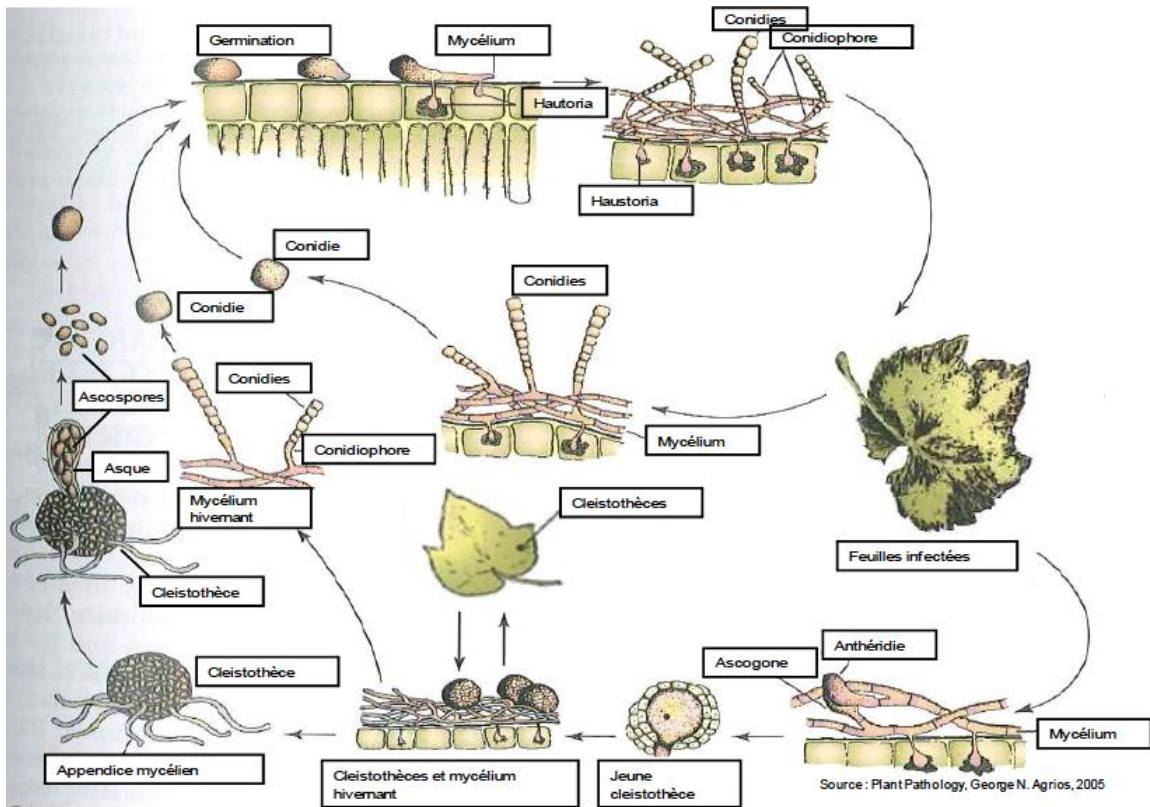
Il peut faire alterner une phase sexuée ou phase sporophytique comprenant la production de cléistothèces contenant des ascospores, et une phase asexuée ou phase gamétophytique conduisant à la formation de conidiophores portant des conidies (Figure 9a) (Galet, 1977).

Durant la phase hivernale de repos de la vigne, le champignon survit sous forme d'hyphe dans les bourgeons dormants, ou de cléistothèces à la surface de la plante. Les cléistothèces comprennent 4 à 6 asques, contenant eux-mêmes les ascospores (4 à 8 par asque). Ces spores seront libérées au printemps pour aller germer sur la surface des bourgeons et des jeunes feuilles, lors des infections primaires. Au bout du tube germinatif, une structure spéciale appelée « appressorium » se forme. Cet appressorium multilobé génère une pression suffisante pour permettre au champignon de percer la cuticule et la paroi cellulaire de l'hôte. Il émet un pédoncule, à partir duquel se différencie par invagination de la membrane cellulaire de la plante un haustorium globuleux, grâce auquel l'agent pathogène puise ses nutriments pour se reproduire et compléter son cycle de vie (Heintz & Blaich, 1990; Corio-Costet, 2007; Glawe, 2008). L'appressorium primaire se forme 3,5 heures après le dépôt de la spore sur la paroi de l'hôte. Un hyphe primaire se développe ensuite sur la surface de la feuille environ 14 heures après l'infection, du côté opposé à l'appressorium, puis à 18 heures après infection un hyphe secondaire se développe, du même côté que l'appressorium primaire cette fois (Rumbolz *et al.*, 2000). Dès lors, un réseau mycélien de plus en plus complexe et ramifié tapisse la surface foliaire, et de multiples structures appressorium/haustorium se forment le long du mycélium en croissance. Quatre à six jours plus tard, des conidiophores se différencient à partir du mycélium, constituant le début de l'étape de sporulation. Les conidiophores portent généralement de 3 à 6 conidies, qui coloniseront d'autres tissus verts de la plante, donnant lieu aux infections secondaires.

Contrairement au mildiou, l'oïdium ne nécessite pas d'eau liquide pour germer, cependant le développement des conidies requiert un état d'hygrométrie élevé (Corio-Costet, 2007). La température optimale pour la germination des conidies se situe entre 20 et 25°C (Corio-Costet, 2007).

### **II.3.2 Symptômes**

La présence du mycélium et des conidiophores portant les conidies à la surface des tissus infectés de l'hôte donne une apparence poudreuse de couleur blanche grisâtre (Figure 9b1). Les inflorescences sont quelquefois attaquées dès leur sortie. Le feutrage blanc se développe sur les boutons floraux qui se dessèchent. Seules les jeunes baies ayant un taux de sucre <8% sont sensibles à l'oïdium (Figure 9b2), mais les infections établies continuent à produire des spores jusqu'à ce que la baie contienne 15% de sucre (Pearson, dans Pearson & Goheen, 1988). Des travaux plus récents ont révélé l'existence d'une résistance dite « ontogénique » chez la vigne, qui limite le développement de l'agent pathogène à mesure que les fruits vieillissent. Il devient ainsi de plus en plus difficile pour le champignon de pénétrer et de survivre sur l'épiderme des baies plus âgés, bien que les conidies déposées soient capables de germer et de former un appressorium (Ficke *et al.*, 2002; Gadoury *et al.*, 2001, 2003). Si les baies sont infectées avant d'atteindre leur taille adulte, les cellules épidermiques sont tuées, stoppant ainsi la croissance de l'épiderme. Comme la pulpe continue néanmoins de croître, la baie craque littéralement sous la pression interne (Figure 9b3). Les grains éclatés peuvent favoriser la pénétration des champignons de la pourriture grise. En ce qui concerne les feuilles, Pearson & Goheen (1988) reportent que toutes les surfaces foliaires peuvent être sensibles à l'infection peu importe leur âge. Néanmoins d'autres travaux démontrent que la sensibilité à l'oïdium est plus importante sur les jeunes feuilles à cuticule fine des plantes en période de croissance rapide (Doster & Schnathorst, 1985; Cartolaro & Steva, 1990). Les jeunes feuilles infectées prennent d'abord une coloration vert foncé terne par plages, tandis que les bords se crispent, puis les feuilles deviennent déformées et rabougries. Occasionnellement, la surface supérieure des feuilles peut présenter des tâches de teinte plus claire et plus jaune qui ressemblent aux tâches d'huile du mildiou (Galet, 1977).



**Figure 9a.** Cycle de vie d'*Erysiphe necator*, l'agent causal de l'oïdium de la vigne (Agrios, 2005).



**Figure 9b.** Symptômes de l'oïdium de la vigne (photothèque INRA Colmar). (1) Sur la face adaxiale des feuilles ; (2) sur de jeunes baies ; (3) sur des baies plus âgées.

### ***II.3.3 Biologie des populations d'oidium***

En Europe et en Australie, les populations d'*E. necator* sont structurées en deux groupes, ou biotypes, génétiquement distincts, qui correspondent au type d'inoculum primaire ou au calendrier d'infection de l'agent pathogène lors d'une épidémie. Ces deux groupes, initialement appelés Groupe I et Groupe III (Délye *et al.*, 1997) ont par la suite été renommés Groupe A et Groupe B (Evans *et al.*, 1997). Des isolats des groupes A et B ont été identifiés dans bon nombre de pays cultivateurs de vigne, dont la France (Delye & Corio-Costet, 1998), l'Australie (Evans, Scott, *et al.*, 1997), l'Italie (Miazzi *et al.*, 2003) et l'Espagne (Núñez *et al.*, 2006).

Les isolats du groupe A sont retrouvés tôt dans la saison sur les bourgeons par exemple, quand le mycélium passe l'hiver dans ces organes infectés pendant la saison précédente. Les isolats du groupe B sont quant à eux retrouvés plus tard dans la saison, sur les feuilles et/ou les fruits. Ils proviennent vraisemblablement des ascospores, qui passent l'hiver dans les cléistothèces (Delye & Corio-Costet 1998; Péros *et al.* 2005; Brewer & Milgroom 2010). En France, le groupe A est caractérisé par une faible diversité génétique et a été interprété comme étant clonal, tandis que les isolats de groupe B sont plus diversifiés génétiquement et peuvent se reproduire sexuellement (Corio-Costet, 2007). Les fréquences des groupes génétiques d'*E. necator* varient considérablement selon les vignobles, et les deux groupes peuvent coexister dans le même vignoble (Cortesi *et al.* 2005; Amrani & Corio-Costet 2006; Bouscaut & Corio-Costet 2007; Corio-Costet, 2007; Willocquet *et al.* 2007; Montarry *et al.* 2008). Montarry *et al.* (2008) ont démontré que l'isolation temporelle des deux groupes au cours de la saison prévient la recombinaison entre les isolats des groupes A et B, ce qui favorise le maintien de structures génétiques hautement différenciées dans les populations d'*E. necator*, malgré l'interfertilité de ces deux groupes démontrée dans des expériences de croisements contrôlés (Miazzi *et al.*, 2003; Stummer & Scott, 2003). Une comparaison des traits d'histoire de vie déterminant l'agressivité de souches appartenant aux deux groupes génétiques a également montré que le groupe A était moins agressif que le groupe B en terme de taux de germination des conidies et d'efficacité d'infection, mais plus agressif que le groupe B en terme de période de latence, de diamètre des lésions et du nombre de spores par lésion (Montarry *et al.*, 2008).

Aux Etats-Unis, la structuration génétique est différente de celle retrouvée en Europe. Les populations de l'est des Etats-Unis sont plus diverses génotypiquement que celles d'Europe, d'Australie et même de l'ouest des Etats-Unis. Cela paraît sensé si l'on considère que les populations natives d'oïdium sont originaires du nord-est américain, une région dans laquelle la co-évolution hôte/agent pathogène a pu se faire sur une période beaucoup plus longue. Aucune différenciation génétique hôte spécifique n'a été trouvée, excepté pour *M rotundifolia*. Les populations d'*E. necator* qui se développent sur la muscadine sont génétiquement distinctes de celles observées sur les autres espèces de *Vitis* (Brewer & Milgroom, 2010). Il est possible que ces populations soient dans un stade précoce de spéciation résultant d'une spécialisation d'hôte, ou bien les isolats qui poussent sur muscadine possèdent des allèles qui permettent d'éviter la reconnaissance de l'agent pathogène par les défenses de l'hôte dans une interaction gène pour gène (Brewer & Milgroom, 2010).

Les populations d'*E. necator* introduites en Europe à la fin du XIXème siècle ont comme ancêtre une population du nord-est des Etats-Unis. Brewer et Milgroom (2010) ont montré qu'au moins deux haplotypes d'oïdium de vigne, progéniteurs des groupes A et B, ont été introduits et ont colonisé l'Europe et l'Australie. Ces introductions et invasions fructueuses ont pu se produire séparément dans le temps, ou bien plusieurs haplotypes distincts ont été introduits lors d'un seul événement. Dans le nord-est des Etats-Unis, on retrouve des isolats ayant le même haplotype multilocus que ceux du groupe A européen, alors qu'aucun isolat ne correspond à l'haplotype des souches du Groupe B européen. Les haplotypes du groupe B ont très certainement divergé par dérive génétique à partir des souches originales depuis les premières introductions en Europe il y a plus de 160 ans (Brewer & Milgroom, 2010). La reproduction sexuée et la recombinaison au sein du groupe B, associées à la sélection de nouveaux haplotypes sur différentes espèces hôtes en Europe, et dans différentes conditions environnementales, peuvent également avoir favorisé cette divergence.

### **II.4 Les stratégies de lutte contre les maladies de la vigne**

La plante et l'agent pathogène se livrent en permanence une lutte acharnée, de laquelle dépendent leurs survies respectives. Dans ce combat naturel, l'homme est obligé d'intervenir en faveur de la plante pour ne pas voir ses cultures ravagées par les maladies. Il développe pour cela des moyens de lutte pour enrayer le développement des

parasites nuisibles. En théorie, ces moyens doivent rassembler un maximum de qualités et démontrer leur efficacité, et dans le même temps avoir un impact négatif minimum sur les plantes et l'environnement. La réalité en est souvent éloignée, néanmoins si aucune solution n'est parfaite, il est important de réfléchir aux meilleurs moyens d'y parvenir.

Dans cette partie sont présentés les principaux moyens de lutte contre les maladies de la vigne employés de nos jours.

### ***II.4.1 Les produits phytosanitaires***

A l'heure actuelle, outre le phylloxera qui est maintenant parfaitement enrayé grâce au processus de greffage, le principal moyen de lutte contre les maladies qui touchent le plus sévèrement les vignobles est l'utilisation de pesticides et fongicides en grande quantité. La pression sanitaire est donc particulièrement forte en viticulture.

L'indicateur central de mesure de la pression sanitaire utilisé est l'IFT, ou Indicateur de Fréquence des Traitements. Il est mesuré dans les enquêtes sur les pratiques culturales sur les grandes cultures et la viticulture. L'IFT moyen de la vigne est de 13. Comparativement, il est en moyenne de 3,8 en grandes cultures, variant sensiblement selon les plantes : de 2 pour le tournesol, 4 pour le blé, 6 pour le colza jusqu'à 16 pour la pomme de terre. Les fruits sont encore plus touchés avec un IFT de 17 (36 pour les pommes) (Butault *et al.*, 2010). La suppression de l'utilisation de produits de synthèse en agriculture biologique (pesticides et fongicides notamment) se traduit par des pertes de rendement importantes, atteignant jusqu'à 25% pour les vignes (Butault *et al.*, 2010) et ce malgré l'utilisation de traitements à base de cuivre et de soufre.

Les traitements fongicides destinés à lutter principalement contre le mildiou et l'oïdium sont appliqués selon un calendrier précis pour prévenir les dommages dus à l'apparition d'une maladie. L'Union Européenne (UE) emploie environ 68 000 tonnes de fongicides par an pour contrôler les maladies de la vigne, ce qui représente 65% des fongicides utilisés dans l'agriculture. Ce chiffre est encore plus préoccupant si l'on considère que seulement 3,3 % de la surface agricole utile de l'UE est occupée par la vigne (Eurostat, 2007).

Cependant le plan Ecophyto 2018, une des mesures proposées en France par le Grenelle de l'environnement fin 2007 et reprise ensuite par le PNSE2 (second Plan National Santé Environnement en 2009), vise à réduire et à sécuriser l'utilisation des produits



phytosanitaires, y compris pour des usages non agricoles. L'un des objectifs est de diviser par deux l'usage de pesticides avant 2018. Cette formulation est toutefois ambiguë car elle ne précise pas s'il s'agit de tonnage, de matière active, des produits les plus ou les moins utilisés, des produits les plus toxiques, etc. Dans ce cadre s'inscrit par exemple la mise au point de capteurs pour renforcer la précision de l'opération de traitement phytosanitaire. Plusieurs firmes travaillent ainsi sur la création de pulvérisateurs dits "intelligents", qui permettent de diminuer la dose de produit appliquée et surtout d'augmenter la précision d'application.

Des modèles de prédictions et de simulations épidémiologiques ont également été développés en tant que méthodes préventives pour limiter les applications de produits chimiques sur la vigne pour le mildiou (Tran Manh Sung *et al.*, 1990; Viret *et al.*, 2001) et l'oïdium (Calonnec *et al.*, 2008; Carisse *et al.*, 2009). Ces modèles intègrent des données climatiques et la connaissance de la biologie de l'agent pathogène pour aider les viticulteurs à décider de la stratégie de contrôle adéquate et ainsi mieux gérer les intervalles de temps entre les applications de produits fongicides. Cependant, l'évaluation précise de la sévérité de la maladie, permettant d'avoir une prédiction quantitative efficace, est très délicate car il est très difficile d'évaluer précisément la contribution des infections primaires et secondaires dans la propagation de l'agent pathogène (Gobbin *et al.*, 2006).

Enfin, des indicateurs peuvent être développés afin d'améliorer la gestion des traitements fongicides. C'est l'objectif principal du processus « Mildium », initié en 2005 à l'UMR Santé Végétale de l'INRA de Bordeaux, et impliquant ensuite la collaboration successive de divers organismes : le Cemagref (Montpellier), l'ENITA (Bordeaux), l'INRA (Bordeaux, Montpellier, Ivry), l'IFV et plusieurs Chambres d'Agriculture (Delière *et al.*, 2008). L'objectif environnemental du processus Mildium est une réduction significative de la quantité de traitements fongicides plus particulièrement ceux destinés à protéger la vigne contre le mildiou et l'oïdium, tout en maintenant les objectifs de production des viticulteurs. Cette réduction est ici recherchée par la limitation du nombre de passages, et non pas par la réduction de la dose appliquée à chaque traitement. Les principaux indicateurs utilisés sont de trois types. Le premier, commun au mildiou et à l'oïdium, est basé sur l'observation dans la parcelle des symptômes sur les feuilles et les grappes. Pour le mildiou, deux indicateurs complémentaires sont pris en compte : (i) le niveau de risque local qui permet d'appréhender, sur une échelle géographique plus large que la parcelle, le risque de



développement du mildiou. Celui-ci est évalué grâce à des réseaux d'observations et à des modèles climatiques de risque disponibles pour les viticulteurs ; (ii) les événements pluvieux annoncés par le service prévisionnel de Météo-France, la propagation du mildiou étant fortement favorisée par l'humidité.

#### ***II.4.2 Les stimulateurs de défense naturelles***

Un moyen d'améliorer la lutte de la plante contre les attaques des agents pathogènes est de stimuler ses propres défenses. Ce phénomène d'activation d'un processus de défense suite à la reconnaissance d'une molécule liée à l'agresseur (produite par l'agresseur ou résultant de l'agression) est appelé « élicitation ». En d'autres termes, on stimule le potentiel immunitaire des plantes par des substances ou produits biologiques appelés « stimulateurs de défense naturelle » ou SDN. Ces molécules activent la défense systémique induite de la plante (voir chapitre III, Les mécanismes moléculaires de défense des plantes contre les agents pathogènes). L'utilisation de ces SDN en champ peut être couplée à l'utilisation de fongicides et permet ainsi d'améliorer la défense de la plante, tout en diminuant les quantités de fongicides appliquées.

Parmi les SDN testés sur la vigne pour simuler une attaque fongique comme celle du mildiou, de l'oïdium ou de *Botrytis*, plusieurs ont démontré leur efficacité : l'ergosterol (lipide), la laminarine et Lam13 ( $\beta$ -1,3 glucanes), le PS3 (laminarine sulfatée), l'OGA (oligogalacturonide), le chitosane ( $\beta$ -1,4 glucosamine), l'acide salicylique, le BABA (acide  $\beta$ -aminobutyrique, acide aminé synthétique) ou le chlorure d'aluminium  $AlCl_3$  (Allègre *et al.*, 2009; Reglinski *et al.*, 2010; Bejan & Visoiu, 2011). L'activité antifongique des phosphonates et de leurs dérivés, ainsi que du benzothiadiazole (BTH), un analogue de l'acide salicylique, ont également été démontrés vis à vis de *P. viticola* et *E. necator* (Dufour *et al.*, 2009; Dufour, 2011; Dufour *et al.*, 2012). Les essais réalisés jusqu'à présent en conditions contrôlées de laboratoire sont prometteurs, mais les résultats obtenus sont souvent difficilement reproductibles sur le terrain. Les raisons en sont multiples : des différences d'efficacité des molécules ou d'état physiologique des plantes, des difficultés à établir un protocole d'application, des problèmes de pénétration des molécules dans la plante ou de spécificité d'un agent pathogène particulier vis à vis de son hôte. Seuls peu de produits atteignent le niveau d'efficacité requis en champ. La plupart montrent des effets de protection contre la maladie insuffisants ou en tous cas inférieurs par rapports aux traitements classiques (Schaerer *et al.*, 2006; Reglinski *et al.*, 2010). De plus, la consommation d'une quantité importante

d'énergie, lors de la suractivation de voies métaboliques particulières au détriment d'autres, pourrait conduire à la baisse de la qualité du produit fini.

### **II.4.3 La lutte biologique**

Dans certains cas, la lutte biologique, c'est-à-dire l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts provoqués par des ravageurs, peut s'avérer efficace contre les agents pathogènes nuisibles chez la vigne.

Plusieurs organismes ont montré des résultats prometteurs comme agents de lutte biologique contre le mildiou de la vigne. C'est le cas de *Epicoccum nigrum* (Kortekamp, 1997), *Acremonium byssoïdes* (Burruano *et al.*, 1998), et *Fusarium proliferatum* (Falk *et al.*, 1996; Bakshi *et al.*, 2001). Un autre exemple est présenté dans les travaux de Musetti *et al.* (2006), qui démontrent que l'endophyte de la vigne *Alternaria alternata* induit des modifications de l'ultrastructure du mycélium de *P. viticola*, inhibant la sporulation. Certains métabolites appartenant à la famille des diketopiperazines, et extraits de cultures liquides d'*A. alternata*, ont par ailleurs montré une remarquable capacité à empêcher la sporulation de *P. viticola* (Musetti *et al.*, 2006). Le mycoparasite *Ampelomyces Quisqualis* est également connu comme étant un hyperparasite naturel de l'oïdium, dont l'oïdium de la vigne *E. necator*. Il permet de contrôler partiellement le développement de la maladie (Falk *et al.*, 1995).

La bactérie *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN (Sessitsch *et al.*, 2005), initialement isolée sur des racines d'oignons, est connue pour protéger les vignes contre *Botrytis cinerea* (Barka *et al.* 2000; Barka *et al.* 2002). Cette protection systémique améliore la résistance de la plante aux stress biotiques et abiotiques. Ce phénomène est connu sous le nom de « résistance systémique induite » médiée par des rhizobactéries (Van Loon *et al.*, 1998).

Des chercheurs de l'INRA de Bordeaux se sont également récemment penchés sur l'utilisation de *Pythium oligandrum* pour lutter contre les maladies du bois telle que l'Esca. *P. oligandrum* est un oomycète connu comme agent de lutte biologique qui présente deux modes d'action : un effet indirect par induction de résistance chez les plantes, et un effet direct par le contrôle qu'il exerce sur le développement des agents pathogènes de la rhizosphère (via le mycoparasitisme, l'antibiose et la compétition nutritive). *P. oligandrum* colonise fréquemment les racines des ceps de vigne. Il permet

d'améliorer la protection des ceps contre un des champignons impliqués dans les maladies du bois, *Phaeomoniella chlamydospora*, comme en témoigne l'induction de résistance des plants lors des attaques de *P. chlamydospora* (Bruez *et al.*, 2011).

Très récemment, une nouvelle espèce de papillon défoliateur ravageur de la vigne a été décrite et baptisée *Antispila oinophylla*. Cet insecte originaire d'Amérique du Nord est présent depuis 2006 dans les vignobles du nord de l'Italie. Il n'a pour le moment pas entraîné de graves dégâts économiques grâce à la présence de guêpes parasitoïdes, comme celles de la famille des eulophidés, qui permettent de réguler ce type de ravageurs. Toutefois, la défoliation, dans certaines vignes italiennes, est assez importante pour que les viticulteurs s'en inquiètent. En cas d'accroissement brutal des populations du papillon ravageur, l'utilisation de ces hyménoptères en tant qu'agent de lutte biologique apparaîtra probablement comme la meilleure solution (Bruez *et al.*, 2011).

#### **II.4.4 La création de variétés résistantes**

De nombreux travaux de recherche menés dans les espèces d'intérêt agronomique, dans le but de contrôler le développement des maladies, visent à introgresser des gènes de résistance issus de variétés sauvages résistantes, dans les variétés élites cultivées sensibles. La présence de ces régions peut protéger intégralement et efficacement contre plusieurs souches d'agents pathogènes en présentant des effets collatéraux mineurs.

Chez la vigne, plusieurs programmes d'amélioration et de sélection variétale par croisements ont déjà été engagés, ouvrant une voie prometteuse à la commercialisation de variétés résistantes conservant des qualités agronomiques et œnologiques de très haut niveau.

La création de nouvelles variétés résistantes nécessite une bonne connaissance des mécanismes de défense de la plante lors d'une attaque pathogène, et du déterminisme génétique de ces défenses. Les deux chapitres suivants sont donc consacrés à la présentation des mécanismes moléculaires de défense des plantes, et des principaux facteurs de résistance mis en évidence à ce jour chez les plantes. Puis l'intérêt et les enjeux de la sélection pour la résistance chez la vigne en particulier seront développés dans le chapitre V.

### **III. Les mécanismes moléculaires de défense des plantes contre les agents pathogènes**

Pour échapper aux attaques des populations d'agents pathogènes, les plantes ont déployé au cours de l'évolution plusieurs mécanismes de défense. Cependant, les parasites ont eux aussi développé en parallèle un arsenal d'armes moléculaires afin de contourner le système de surveillance de l'hôte. Les agents pathogènes et leurs hôtes respectifs sont donc continuellement engagés dans une course à l'évolution dans laquelle chaque partie essaie de surmonter les stratégies adverses (théorie de la « Reine Rouge » en biologie évolutive). L'amélioration des connaissances sur les mécanismes de résistance, associée à celles des stratégies de pathogénicité, constitue un objectif majeur pour la recherche scientifique actuelle. Cette partie introduit les bases moléculaires du système immunitaire des plantes et de la virulence des agents pathogènes.

#### **III.1 Le système de défense des plantes**

En conditions naturelles, les plantes sont en contact permanent avec une multitude de microbes qui ont, pour certains, développé un style de vie parasitaire. Les stratégies d'attaque des agents pathogènes sont très variées, mais imposent toutes un changement dans le métabolisme de l'hôte afin d'assurer leur propre survie. Les parasites et leurs hôtes ont pu co-évoluer au fil du temps, conduisant à augmenter la complexité des voies biologiques impliquées dans la course défense/attaque pour contourner la partie adverse. Les vertébrés ont par exemple développé un système immunitaire adapté sophistiqué, pourvu de cellules mobiles et d'une bonne « mémoire ». A l'inverse, la défense des plantes repose sur une immunité innée non-spécifique et sur la diffusion de signaux systémiques à partir du site d'infection (Holub 2001; Jones 2001; Jones & Dangl 2006). La résistance est un phénomène complexe impliquant plusieurs voies métaboliques imbriquées, avec des étapes intermédiaires qui se chevauchent. Cela exige un engagement substantiel des ressources cellulaires de la plante et de vastes changements, comme une large reprogrammation génétique et des réallocations métaboliques. C'est pourquoi ce processus n'est activé que si les plantes détectent un agent pathogène potentiel (Somssich & Hahlbrock, 1998). De manière synthétique, le système immunitaire des plantes peut être décomposé en 4 étapes (Figure 10).

### Etape 1

Les molécules microbiennes courantes, comme la flagelline bactérienne ou des composants de la paroi cellulaire des agents pathogènes, sont considérées comme des éliciteurs non spécifiques. Ils sont regroupés sous le nom de Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs). Les PAMPs sont reconnus par des récepteurs transmembranaires, ou Pattern Recognition Receptors (PRRs), donnant lieu à ce que l'on nomme la PAMP-Triggered Immunity (PTI), une réaction capable de stopper la colonisation microbienne. Cette étape repose sur la détection de petits motifs conservés appartenant à des molécules indispensables à l'agent pathogène, et qui sont reconnus par le système immunitaire inné de la plante comme des marqueurs de la présence d'un agent étranger. La PTI se déroule principalement dans l'apoplasme.

### Etape 2

Les agents pathogènes ont développé une collection d'effecteurs aux fonctions variables, ayant pour but de promouvoir leur croissance ou d'inhiber la PTI. Ces effecteurs entravent la réponse immune basale de la plante ou PTI (étape 1) et permettent la progression de la colonisation de l'agent pathogène. Cette étape constitue l'Effector Triggered Susceptibility (ETS).

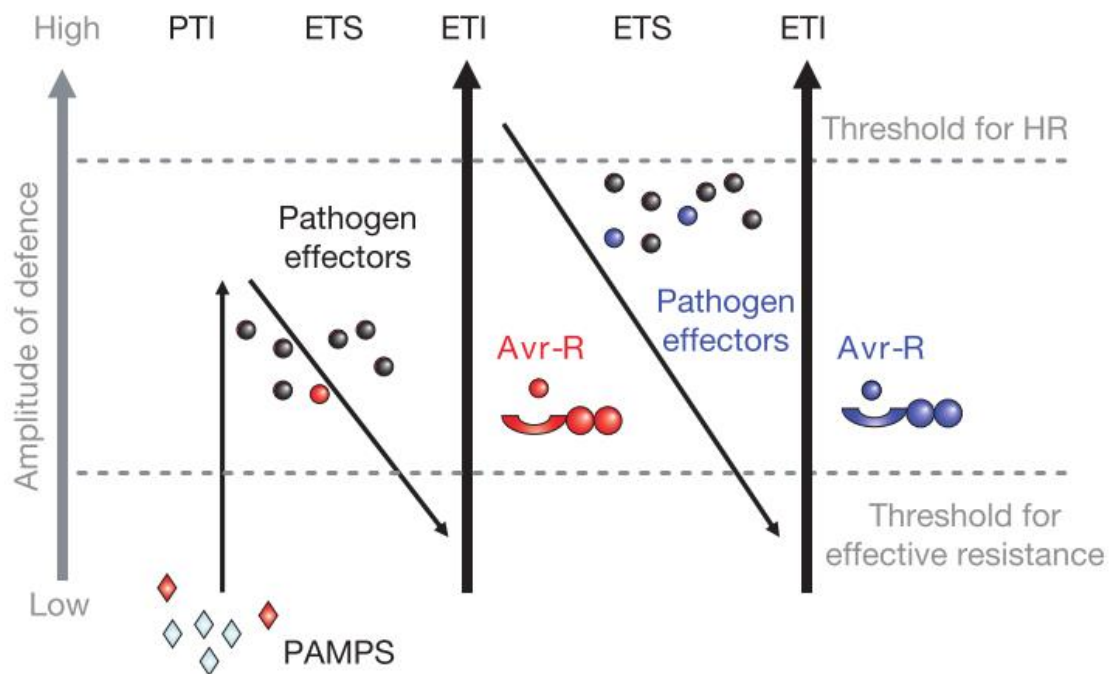
### Etape 3

Cette phase représente le passage à une seconde section de la résistance qui se déroule principalement à l'intérieur de la cellule. Elle repose de façon stricte sur la spécificité d'interaction entre une protéine issue d'un gène de résistance de la plante (gène R, voir chapitre III.2) et une molécule d'avirulence Avr de l'agent pathogène. La liaison entre les deux types de molécules déclenche des réponses rapides de défense (Effector Triggered Immunity ou ETI), qui peuvent aboutir à la mort des cellules qui se trouvent à proximité du site d'infection. C'est ce que l'on appelle une réaction d'hypersensibilité (en anglais Hypersensitive cell death Response ou HR).

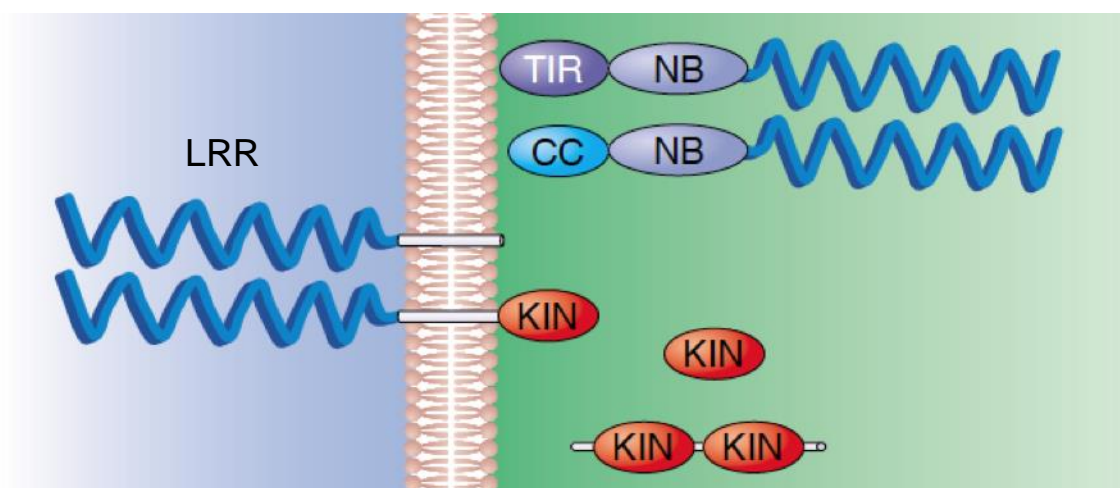
### Etape 4

Les agents pathogènes doivent en permanence développer de nouvelles stratégies pour supprimer ou au moins réduire l'ETI, en diversifiant ou en modifiant les effecteurs reconnus par la plante. En même temps cela implique chez la plante la sélection de

nouveaux gènes R adaptés pour détecter les nouveaux effecteurs, et ainsi de suite. Sur ce champ de bataille, chaque partie lutte pour sa survie et celle de son espèce.



**Figure 10.** Diagramme illustrant le fonctionnement sur plusieurs niveaux du système immunitaire des plantes selon le modèle en « zig-zag » (Jones & Dangl 2006).



**Figure 11.** Les principales familles de protéines de résistance (d'après McDowell & Woffenden, 2003). TIR : Toll/Interleukin Receptor ; CC : coiled-coil ; NB : Nucleotide Binding site ; LRR : Leucine Rich Repeat ; KIN : domaine Serine/Threonine Kinase.

### III.2 La résistance gène pour gène

La résistance de type ETI implique une reconnaissance spécifique médiée par les gènes de résistance (gènes R). Les gènes R eux-même codent pour différentes familles de protéines présentant des motifs caractéristiques (Figure 11). Ces protéines fournissent une machinerie universelle pour la détection d'un large spectre d'agents pathogènes ayant différents styles de vie (champignons, nématodes, virus, etc). Elles peuvent rapidement évoluer et s'adapter à de nouveaux déterminants pathogéniques. Quel que soit l'agent pathogène ciblé, elles présentent les mêmes motifs structuraux entre plantes non apparentées, et possèdent certaines homologies avec les vertébrés également. Les gènes R codent pour des protéines situées dans différents compartiments cellulaires, et se classent principalement dans les catégories suivantes : les récepteurs transmembranaires, avec ou sans domaine kinase C-terminal, les kinases cytosoliques et les protéines cytosoliques possédant un site de liaison aux nucléotides.

La plupart des protéines R appartiennent à une des cinq classes présentées ci-dessous, selon la combinaison de motifs structuraux qu'elles possèdent (Figure 11) :

- Les protéines caractérisées par la présence d'une région de répétitions riches en leucine (Leucine Rich Repeats ou LRRs), un site de liaison aux nucléotides (Nucleotide Binding Site ou NBS), et un motif Toll/interleukin-1 (TIR).

Le domaine NBS a une fonction primaire qui est de se lier aux ATP ou GTP (Saraste *et al.*, 1990). Des mutations dans ce domaine inactivent la transmission du signal (Tao *et al.*, 2000). C'est un motif plutôt bien conservé qui présente de l'homologie avec certains effecteurs eucaryotes induisant la mort cellulaire (Van Der Biezen & Jones, 1998; Aravind *et al.*, 1999).

Le domaine LRR est impliqué dans la liaison au ligand, l'interaction protéine-protéine ou protéine-carbohydrate (Kajava, 1998; Kobe & Kajava, 2001). C'est une structure très adaptable sur laquelle différentes spécificités de liaison peuvent apparaître (Bent & Mackey, 2007). Contrairement au motif NBS, le motif LRR peut présenter une grande variabilité au niveau des acides aminés qui le composent. Le fort polymorphisme allélique du domaine LRR contribue à l'hypothèse qu'une pression sélective peut agir sur ce domaine en favorisant l'adoption de nouvelles spécificités de reconnaissance par les nouvelles races d'agents pathogènes (Bent & Mackey, 2007).

Le nom du domaine TIR vient de son homologie avec les domaines de

signalisation intracellulaire du récepteur Toll de la drosophile et les récepteurs à interleukines des mammifères. Il est impliqué dans les interactions liées à la transduction du signal (Martin *et al.*, 2003).

- Une classe similaire de protéines NBS-LRR cytoplasmiques présentant un domaine alternatif N-terminal, caractérisé par un motif Coiled-Coil (CC).  
Le domaine CC est un oligomère, constitué d'un nombre variable de structures hélicoïdales à résidus hydrophobes. Il est impliqué dans l'interaction protéine-protéine, soit pour la reconnaissance des facteurs d'avirulence, soit pour la régulation de l'activité NBS-LRR (Martin *et al.*, 2003).
- Les protéines possédant des domaines transmembranaires associés à un domaine LRR extracellulaire et une petite queue cytoplasmique. Les protéines Cf-x de la tomate, par exemple, appartiennent à cette classe (Jones *et al.* 1994).
- Les protéines possédant des domaines transmembranaires associés à un domaine LRR extracellulaire et un domaine cytoplasmique de type Receptor-Like Kinase (RLK), comme par exemple la protéine Xa21 du riz (Song *et al.*, 1995).
- Les protéines de résistance cytoplasmiques possédant un domaine catalytique Sérine/Thréonine Kinase (KIN), comme par exemple la protéine codée par le gène *Pto* chez la tomate (Martin *et al.*, 2003).

La plupart des gènes R provoquent chez la plante une réponse d'hypersensibilité (HR) au site d'infection et des réactions de morts cellulaires programmées, via des cascades de voies de signalisation (Jones & Dangl, 2006). Les gènes R codant pour des protéines NBS-LRR sont communément organisés en clusters dans les génomes des plantes. Ces clusters évoluent de manière dynamique et produisent parfois de nouvelles spécificités de résistance (Michelmore & Meyers, 1998; Richter & Ronald, 2000; Hulbert *et al.*, 2001; Meyers *et al.*, 2003; Leister, 2004; Monosi *et al.*, 2004).

Les clusters peuvent évoluer par duplications, et par la divergence d'un seul gène ancestral qui en découle, ou contenir des gènes à l'origine non apparentés qui ont été rassemblés par des réarrangements chromosomiques (Hulbert *et al.*, 2001). La variation interspécifique des clusters de gènes R est créée par des mécanismes génétiques tels que la conversion génique, le crossing-over inégal et l'échange de séquence (Meyers *et al.*, 2003; Kuang *et al.*, 2004; Mondragon-Palomino & Gaut, 2005).



### III.3 Les principaux gènes de résistance aux mildioux et oïdiums identifiés chez les plantes supérieures

#### III.3.1 Les gènes de résistance aux mildioux

Les principaux gènes de résistance aux mildioux identifiés chez les plantes supérieures sont présentés dans le tableau 2. De manière générale, ces gènes sont en majorité dominants, et un certain nombre d'entre eux ont déjà fait l'objet de contournements de la part de l'agent pathogène correspondant (Tableau 2).

Chez le tournesol, seuls les gènes *Pl<sub>8</sub>*, *Pl<sub>Arg</sub>* et *Pl<sub>15</sub>* apportent aujourd'hui la résistance contre l'ensemble des 37 pathotypes de souches de *Plasmopara halstedii* connues à ce jour (Liu *et al.* 2012). En France, huit souches de *P. halstedii* capables de contourner les gènes *Pl<sub>2</sub>* et *Pl<sub>6</sub>* ont été mises en évidence (Delmotte *et al.* 2008).

Chez la laitue, 19 gènes *Dm* ont été identifiés et introgressés dans des cultivars commerciaux à partir de ressources génétiques cultivées ou d'espèces apparentées proches telles que *Lactuca serriola* (Landry *et al.* 1987; Crute 1992; Bonnier *et al.* 1994; Van Ettekoven & Van der Arend 1999). La résistance apportée par les gènes *Dm* n'est cependant pas durable, car ces gènes sont devenus inefficaces peu de temps après leur introduction suite à l'adaptation génétique rapide de l'agent pathogène (Crute 1992; Lebeda & Schwinn 1994; Reinink 1999).

Chez la pomme de terre, le vaste déploiement des gènes *RI* à *RII* a abouti à une perte de leur efficacité (Turkensteen, 1993). Des gènes R supplémentaires ont été cartographiés dans d'autres espèces apparentées à la pomme de terre sauvage (Wang *et al.* 2008) mais ils pourraient également être rapidement contournés par les souches de *P. infestans* qui évoluent très rapidement (Danan *et al.*, 2009).

Par ailleurs, les recherches effectuées chez les Cucurbitaceae indiquent des différences majeures dans la génétique de la résistance du concombre et du melon au mildiou *P. cubensis*. Chez le concombre, la résistance au mildiou est vraisemblablement déterminée par un ou plusieurs gène(s) récessif(s), alors que chez le melon, elle est déterminée par des gènes dominants (Olczak-Woltman *et al.*, 2011).

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Famille	Plante d'intérêt agronomique	Agent pathogène	Principaux gènes R identifiés	Mode de résistance principal	Contournements	Références
Asteraceae	Tournesol	<i>Plasmopara halstedii</i>	Gènes <i>Pl</i> : <i>Pl</i> <sub>1</sub> à <i>Pl</i> <sub>16</sub> , <i>Pl</i> <sub>v</sub> , <i>Pl</i> <sub>w</sub> , <i>Pl</i> <sub>x-z</sub> , <i>M</i> <sub>w</sub> , <i>M</i> <sub>x</sub> , <i>Pl</i> <sub>Arg</sub>	D	Oui : <i>Pl</i> <sub>2</sub> et <i>Pl</i> <sub>6</sub>	(Rahim <i>et al.</i> 2002; Dussle <i>et al.</i> 2004; Mulpuri <i>et al.</i> 2009; Bertero de Romano <i>et al.</i> 2010; Bachlava <i>et al.</i> 2011; Liu <i>et al.</i> 2012)
	Laitue	<i>Bremia lactucae</i>	Gènes <i>Dm</i>  <i>R39</i>	D	Oui : Gènes <i>Dm</i>	(Crute 1992; Lebeda & Schwinn 1994; Reinink 1999) (Jeuken & Lindhout 2002)
Brassicaceae	Arabette	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis ex parasitica</i>	Gènes <i>RPP</i> : <i>RPP1</i> à <i>RPP28</i> (sauf <i>RPP15</i> ), <i>RPP31</i>	D	-	(Holub <i>et al.</i> 1994; Holub & Beynon 1997; Parker <i>et al.</i> 1997; Botella <i>et al.</i> 1998; McDowell <i>et al.</i> 1998; Bittner-Eddy <i>et al.</i> 2000; Slusarenko & Schlaich 2003; Sinapidou <i>et al.</i> 2004; Tör <i>et al.</i> 2004)
	Chou ( <i>Brassica oleracea</i> )	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	-	D et R	-	(Mahajan <i>et al.</i> 1995; Jensen <i>et al.</i> 1999; Coelho & Monteiro 2003; Monteiro <i>et al.</i> 2005; Carlsson <i>et al.</i> 2004)
	Chou chinois ( <i>Brassica rapa</i> )	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	<i>BraDM</i> , <i>BrRHP1</i>	D	-	(Niu <i>et al.</i> 1983; Yu <i>et al.</i> 2009; Kim <i>et al.</i> 2011)
Cucurbitaceae	Concombre	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Gènes <i>dm</i> : <i>dm1</i> , <i>dm2</i> , <i>dm3</i>	R	Oui : Gènes <i>dm</i>	(Shimizu <i>et al.</i> 1983; Doruchowski & Lakowska-Ryk 1992)
	Melon	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Gènes <i>Pc</i> : <i>Pc-1</i> , <i>Pc-2</i> , <i>Pc-4</i>	D	-	(Cohen <i>et al.</i> 1985; Thomas 1988; Kenigsbuch & Cohen 1992; Taler <i>et al.</i> 2004; Perchepied <i>et al.</i> 2005)
Solanaceae	Pomme de terre	<i>Phytophthora infestans</i>	Gènes <i>R</i> : <i>R1</i> à <i>R11</i>	D	Oui	(Müller & Black 1952; Wang <i>et al.</i> 2008)
Chenopodiaceae	Epinards	<i>Peronospora farinosa</i>	<i>RPF1</i> à 6	D et R	Oui	(Irish <i>et al.</i> 2008; Correll <i>et al.</i> 2010)
Vitaceae	Vigne	<i>Plasmopara viticola</i>	<i>Rpv1</i>	D	-	(Merdinoglu <i>et al.</i> 2003)

**Tableau 2.** Les principaux gènes de résistance au mildiou identifiés chez les plantes. D = dominant ; R = récessif.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Famille	Plante d'intérêt agronomique	Agent pathogène	Principaux gènes R identifiés	Mode de résistance principal	Contourne-ments	Références
Brassicaceae	Arabette	<i>Erysiphe cruciferarum</i>	RPW6 et 7 RPW8.1 et 8.2	D D	-	(S. Xiao <i>et al.</i> 1997) (S. Xiao <i>et al.</i> 2001)
		<i>Erysiphe cichoracearum</i>	RPW1, 2, 4 et 5 rpw3 RPW8.1 et 8.2	D R D	-	(Adam & Somerville 1996) (S. Xiao <i>et al.</i> 2001)
Cucurbitaceae	Concombre	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Gènes Pm	D et R	-	(Kooistra 1968; Morishita <i>et al.</i> 2003; Zhang 2005)
	Melon	<i>Podosphaera xanthii</i>	Pm1, Pm4, Pm5, Pm-C2, Pm-x, Pm-y, Pm-w	D	-	(Kenigsbuch & Cohen 1992; Epinat <i>et al.</i> 1993) (Pitrat, 1991; Périn <i>et al.</i> , 2002; Teixeira <i>et al.</i> , 2008)
Fabaceae	Soja	<i>Microspheara diffusa</i>	Rmd Rmd_PI243640	D D	-	(Lohnes & Bernard 1992; Buzzell & Haas 1978; Polzin <i>et al.</i> 1994; Graham <i>et al.</i> 2002; Kang & Mian 2010)
	Pois	<i>Erysiphe pisi</i>	er1, er2 Er3	R D	Oui : er2	(Heringa <i>et al.</i> , 1969; Kumar & Singh, 1981; Vaid & Tyagi, 1997; Fondevilla <i>et al.</i> , 2007)
Poaceae	Orge	<i>Blumeria graminis</i>	Locus Mla portant plus de 30 allèles de résistance	D	-	(Zhou <i>et al.</i> , 2001; Seeholzer <i>et al.</i> , 2010)
	Blé	<i>Blumeria graminis</i>	Gènes Pm1 à Pm45, PmG3M	D et R	-	(Liu <i>et al.</i> 2001; Huang & Röder 2004; Zhu <i>et al.</i> 2005; Miranda <i>et al.</i> 2006; Blanco <i>et al.</i> 2008; Lillemo <i>et al.</i> 2008; Hua <i>et al.</i> 2009; Ma <i>et al.</i> 2011; Xie <i>et al.</i> 2012)
Solanaceae	Tomate	<i>Oidium neolycopersici</i>	Gènes Ol : Ol-1, Ol-3 à Ol-6 Ol-2	D R	-	(Ciccarese <i>et al.</i> 1998; De Giovanni <i>et al.</i> 2004; Li <i>et al.</i> 2012)
Vitaceae	Vigne	<i>Erysiphe necator</i>	Run 1 Ren1	D D	-	(Pauquet <i>et al.</i> , 2001; Barker <i>et al.</i> , 2005) (Hoffmann <i>et al.</i> , 2008)

**Tableau 3.** Les principaux gènes de résistance à l'oidium identifiés chez les plantes. D = dominant ; R = récessif.

### **III.3.2 Les gènes de résistance aux oïdiums**

Le tableau 3 présente les principaux gènes de résistance à l'oïdium identifiés chez les plantes supérieures à ce jour. A l'instar des gènes de résistance au mildiou, les gènes de résistance à l'oïdium identifiés à ce jour chez les plantes sont en majorité dominants, et tous ne sont pas toujours efficaces contre toutes les souches d'agent pathogène capables d'infecter spécifiquement une plante.

Chez le pois, le gène récessif *er1* est largement utilisé dans les programmes de sélection et apporte une résistance complète ou incomplète selon les localisations géographiques (Heringa *et al.*, 1969; Tiwari *et al.*, 1997; Fondevilla *et al.*, 2006). Le gène dominant *Er3* a été récemment identifié chez *Pisum fulvum* et a été introduit avec succès dans l'espèce *Pisum sativum* par croisement (Fondevilla *et al.*, 2007). En revanche, le second gène récessif *er2* n'est pas utilisé commercialement. Il confère en effet un bon niveau de résistance à certains endroits, mais est inefficace à d'autres (Tiwari *et al.*, 1997; Fondevilla *et al.*, 2006), et son expression est influencée par la température et l'âge des feuilles.

Chez le blé, la plupart des gènes de résistance identifiés sont spécifiques et susceptibles d'être rapidement contournés par l'agent pathogène. Néanmoins, il a été montré récemment que le gène *Lr34*, transporteur ABC putatif, confère une résistance stable et durable à de multiples agents fongiques chez le blé, dont plusieurs rouilles et l'oïdium. *Lr34* co-ségrège avec *Pm38*, un des gènes de résistance spécifique à l'oïdium du blé, ce qui suggère qu'un seul gène contrôle ces résistances (Spielmeyer *et al.* 2005; Krattinger *et al.* 2009). Ces résultats ont démontré l'existence chez les plantes de facteurs génétiques uniques qui agissent durablement contre plusieurs maladies. Les loci *Sr2* et *Lr27* de résistance à deux types de rouille du blé confèrent ainsi également une résistance à l'oïdium, et il est possible qu'un seul gène en soit à l'origine (Mago *et al.*, 2011).

Par ailleurs, plusieurs études rapportent l'existence chez le concombre d'une corrélation entre la présence des gènes de résistance au mildiou (*dm*) et à l'oïdium (*pm*) (van Vliet & Meysing, 1974; Pivovarov, 1998). Ces gènes sont situés soit au même locus, soit à des loci très liés génétiquement (Fanourakis, 1984). Au contraire, la résistance à ces deux maladies dans le melon brodé est héritée indépendamment (Thomas *et al.*, 1988).

Il est intéressant de noter que le gène *Vat* du melon, qui code pour une protéine de type CC-NBS-LRR conférant à la plante la résistance au puceron *Aphis gossypii*, est un allèle vrai du gène de résistance à l'oïdium *Pm-w* (Dogimont *et al.*, 2008). Deux allèles d'un même gène apportent donc au melon la résistance à deux maladies différentes.

Chez la tomate, les gènes *Ol-4* et *Ol-6* colocalisent avec le gène *Mi-1* de résistance aux nématode et aux pucerons chez la tomate, ce qui indique que le même gène pourrait être à l'origine de ces résistances (Seifi *et al.*, 2011).

### **IV. La recherche de l'architecture génétique des caractères quantitatifs**

#### **IV.1 Principe et intérêt de la recherche de QTL**

Pour certains caractères, il est possible d'évaluer des différences phénotypiques nettes entre les individus d'une population. Ces différences peuvent montrer une variation discrète, dans ce cas le caractère sera dit « qualitatif », ou une variation continue, le caractère sera alors décrit comme « quantitatif ». Un caractère qualitatif correspond généralement à une résistance monogénique, tandis que le contrôle d'un caractère quantitatif est polygénique. La plupart de la variation phénotypique dépend alors de la ségrégation d'un certain nombre de gènes polymorphes. L'effet de ces gènes peut être affecté par les interactions avec d'autres gènes (régulation, contrôle, inhibition), par des mécanismes épigénétiques, et par les conditions environnementales. Il en résulte une variation continue du caractère quantitatif au sein d'une population (Collard *et al.*, 2005).

Des marqueurs moléculaires peuvent être utilisés pour cartographier les régions chromosomiques contrôlant des caractères quantitatifs, ou QTL, pour Quantitative Trait Locus (Geldermann, 1975). Un QTL peut être défini comme une région génomique contenant des gènes associés à un caractère quantitatif particulier (Collard *et al.*, 2005). Dans de nombreux cas, les positions des QTL de résistance aux maladies colocalisent avec des gènes R ou des gènes impliqués dans la réponse de défense générale de la plante. Cela suggère que la résistance conférée par les QTL est basée sur des allèles de ces gènes (Gebhardt & Valkonen, 2001; Niks & Marcel, 2009). Quand un QTL est détecté, l'identification des gènes déterminant le phénotype se fait par une analyse plus détaillée des régions chromosomiques, via la cartographie fine par exemple. Si une région est d'emblée suffisamment précise, les analyses QTL permettent d'inférer

l'implication de gènes candidats et de connaître l'intensité de leur effet potentiel. Cependant, la précision de la localisation des QTL est limitée par la précision de la carte génétique établie pour l'espèce. Les analyses QTL permettent aussi de mettre en exergue des gènes à effet mineur, souvent non détectés par des méthodes de génétique directe comme la mutagenèse.

A ce jour, de nombreuses études de cartographie de QTL ont été réalisées pour un grand nombre de caractères, incluant les résistances aux maladies comme le mildiou et l'oïdium, dans diverses espèces d'intérêt agronomique. Ces informations viennent compléter les données sur les gènes R déjà identifiés, et éventuellement déjà contournés, et permettent de mettre en évidence d'autres sources de résistance dans l'optique de créer des variétés ayant une résistance durable (voir chapitre V.2.3 sur la durabilité des résistances).

### ***IV.1.1 Origine de l'analyse QTL***

De tout temps, les espèces d'intérêt agronomique ont été sélectionnées par l'Homme sur la base de leur phénotype. Les croisements réalisés ont abouti à la création de génotypes plus résistants aux stress, plus riches en tel ou tel composé ou encore plus vigoureux et productifs. L'amélioration de ces caractères n'est possible que s'il existe une variabilité génétique dans le matériel végétal utilisé. Dans le cas d'un caractère quantitatif, cette variabilité est révélée lorsque la distribution des caractères mesurés est continue, indiquant que le phénotype « P » est sous l'influence de facteurs génétiques « G » et de facteurs environnementaux « E » :  $P = G + E$ . Ainsi, la génétique quantitative permet de mettre en relation le phénotype et le génotype (Fischer, 1918). Smith (1937), Thoday (1961) puis Spickett et Thoday (1966) ont montré que les caractères mendéliens pouvaient être utilisés comme marqueurs de régions chromosomiques afin d'identifier des loci agissant sur un caractère quantitatif. Dans les premiers temps, cette approche a été freinée par la difficulté de trouver des marqueurs balisant l'ensemble du génome, les marqueurs employés alors étant morphologiques ou protéiques.

Une avancée majeure dans la caractérisation des caractères quantitatifs s'est produite au cours des années 1980 avec le développement des marqueurs moléculaires. Des régions génomiques affectant un caractère quantitatif ont alors pu être localisées sur des groupes de liaison génétique composés de marqueurs, et représentant les chromosomes de l'espèce étudiée.

Outre la cartographie génétique de caractères quantitatifs, l'analyse QTL permet de rendre compte de l'effet positif ou négatif des loci intervenant dans un phénotype donné. Elle permet également la dissection des interactions génotype/environnement, ce qui facilite l'évaluation de l'héritabilité d'un caractère (Michelmore 2000), c'est-à-dire la part de variation phénotypique expliquée par les facteurs génétiques.

### ***IV.1.2 Outils d'une analyse QTL***

#### ***a) Une descendance en ségrégation***

L'étude de l'association entre les variabilités génotypiques et phénotypiques est basée sur le polymorphisme présent au sein d'une population donnée. Chez les plantes, il est généralement aisé de créer des populations en ségrégation en réalisant des croisements. Les espèces autogames étant souvent peu polymorphes, le choix des parents se fait de préférence sur des lignées pures n'ayant aucun ancêtre commun. Les espèces allogames, hétérozygotes pour de nombreux loci, sont plus riches en polymorphismes. Le choix des parents se dirige alors généralement vers deux individus les plus contrastés possibles pour le caractère à étudier, ou vers l'autofécondation d'un individu particulier d'intérêt.

Les descendance les plus couramment utilisées à l'heure actuelle chez les plantes sont :

- Les rétrocroisements (en anglais backcross, BC). Un BC1 sera le résultat du croisement d'un hybride F1 (première génération d'un croisement) avec l'un de ses parents (Skiba *et al.*, 2004).
- Les descendance F2 issues de l'autofécondation d'individus F1 (Mano *et al.*, 2005).
- Les populations issues de rétrocroisements (en anglais BIL pour Backcross Inbred Lines). L'hybride F1 est croisé avec l'un des parents, et les descendants sont ensuite autofécondés jusqu'à l'obtention de lignées homozygotes (Jeuken & Lindhout 2004; Jeuken *et al.* 2008).
- Les populations « Bulk F3 » issues de l'autofécondation d'individus F2 (Zhou *et al.* 2003).
- Les lignées recombinantes (en anglais RIL pour Recombinant Inbred Lines), obtenues par l'autofécondation d'individus F1, F2 puis F3 ect, jusqu'à la stabilisation des lignées. Les individus à étudier sont homozygotes et polymorphes (Simon *et al.* 2008).

- Les lignées quasi-isogéniques (en anglais NIL pour Nearly Isogenic Lines ou Near-Isogenic Lines). Une plante d'intérêt est croisée avec une lignée standard de la même plante. L'hybride F1 est autofécondé pour produire la F2, puis les individus F2 intéressants sont recroisés avec la lignée standard (le parent récurrent) et ainsi de suite. Les lignées sont génétiquement identiques, à l'exception d'un ou de quelques loci (Szalma *et al.*, 2007).
- Les lignées d'introgression (en anglais IL pour Introgression Lines), qui sont des populations de lignées quasi-isogéniques, c'est à dire issues de rétrocroisements entre une lignée receveuse (celle dont le génome se trouve en proportion majoritaire et qui constitue le fond génétique des lignées) et une lignée donneuse (Rousseaux *et al.*, 2005).
- Les haploïdes doublés, qui sont des plantes diploïdes après avoir subi un doublement chromosomique (Martinez *et al.* 2002; Pink *et al.* 2008)

Les descendances issues de parents homozygotes sont difficilement envisageables avec les espèces pérennes à cycle long comme la vigne, tandis que l'obtention de lignées pures n'est pas possible avec les espèces auto-incompatibles comme c'est le cas de beaucoup de Brassicacées (*Arabidopsis hallieri* et *lyrata* par exemple) ou certaines Astéracées telles que la chicorée, le tournesol ou l'artichaut (Takayama & Isogai, 2005). La vigne est une espèce particulièrement polymorphe, qui présente un taux d'hétérozygotie d'environ 75% (Hocquigny *et al.*, 2004). Cela permet d'obtenir aisément des descendances en ségrégation à partir de backcross, ou de réaliser de simples autofécondations à partir d'une espèce d'intérêt. Le parent peut dans ce cas être apparenté à une F1, dont l'autofécondation donne une descendance de type F2.

### ***b) Les marqueurs moléculaires et la construction d'une carte génétique***

La construction d'une carte génétique à l'aide de marqueurs moléculaires est une étape nécessaire précédant généralement les analyses QTL. Une carte génétique peut être définie comme la représentation du génome d'une espèce, sur laquelle sont placés des repères, ou marqueurs moléculaires, dont on connaît les positions relatives sur les groupes de liaison représentant les chromosomes (Lorieux, 1994). Ces positions sont déterminées en analysant la façon dont les marqueurs ségrégent parmi les descendants d'une population de cartographie. Plus une carte génétique est dense en marqueurs, plus la localisation des QTL détectés et l'identification de leurs effets seront précises.



Il existe de nombreux types de marqueurs moléculaires permettant de révéler du polymorphisme dans l'ADN. Parmi eux se trouvent les microsatellites (en anglais SSR pour Simple Sequence Repeats, polymorphismes d'unité de répétition) et les SNP (acronyme anglais pour Single Nucleotide Polymorphism, polymorphismes d'une seule base nucléotidique).

Lors de la réalisation d'une carte génétique, on recherche préférentiellement des marqueurs :

- Polymorphes, c'est à dire existant sous différents allèles chez les parents
- Nombreux, de façon à augmenter la probabilité de couvrir tout le génome
- Mendéliens, c'est à dire entièrement déterminés par les allèles présents à un seul locus
- Dont les allèles soient si possible co-dominants : si on utilise une population F<sub>2</sub>, les génotypes AA, Aa et aa seront tous distingués, par opposition à la dominance où les individus AA et Aa sont confondus. Le phénomène de dominance entraîne une perte d'information, donc une estimation moins précise des fréquences de recombinaison (Lorieux 1994).

Les marqueurs microsatellites sont très souvent utilisés en cartographie génétique. Ils sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri- ou tétra nucléotidiques, et ont de nombreux avantages, parmi lesquels le fait qu'ils soient présents en très grand nombre dans les génomes eucaryotes, dispersés sur tous les chromosomes, très polymorphes et co-dominants.

Lors de la construction d'une carte génétique, les marqueurs moléculaires sont répartis sur les groupes de liaison suivant le taux de recombinaison ( $r$ ) qui existe entre les marqueurs pris deux à deux. Le taux de recombinaison est proportionnel à la probabilité qu'un crossing-over se produise à la méiose entre les marqueurs : plus la probabilité d'observer un crossing-over entre deux marqueurs est importante, plus la distance génétique entre les deux marqueurs sera grande. Cette distance génétique est exprimée en centiMorgan (cM), où 1cM représente 1 crossing-over tous les 100 produits de méiose.

*c) Le phénotypage*

La deuxième étape clé dans la réalisation d'une analyse QTL est l'évaluation la plus précise et pertinente possible du caractère phénotypique d'intérêt. C'est ce que l'on appelle communément le phénotypage. A l'instar des marqueurs moléculaires, un phénotype n'a d'intérêt que s'il est variable entre les individus de la population de cartographie. Tout l'enjeu et toute la difficulté de cette étape résident dans le fait de disposer de méthodes d'évaluation phénotypiques justes, discriminantes et reproductibles, sans perdre de vue que le paramètre à évaluer sous-tend un phénomène biologique complexe. Dans le cas des résistances aux maladies notamment, plusieurs manifestations phénotypiques peuvent être remarquées pour chaque caractère étudié. Puis pour chaque phénotype, plusieurs types de mesure peuvent être réalisées, pouvant chacune donner lieu à plusieurs interprétations possibles. Malgré l'existence d'échelles de notations de la résistance ou de critères de détermination du phénotype précis, la part humaine représentée par la connaissance de l'expérimentateur sur le phénomène biologique qu'il observe est un facteur important du processus de phénotypage. Cette étape donc donc être réalisée dans les conditions optimales, puisque la qualité du phénotypage va directement influencer la pertinence de la détection des QTL en aval.

*d) L'évaluation de l'héritabilité d'un caractère*

Il est important, dans le cadre d'une analyse QTL, de calculer l'héritabilité des caractères phénotypiques étudiés. L'héritabilité est une statistique estimant le degré d'influence probable des facteurs génétiques pour un phénotype donné, dans une population donnée. Un caractère est dit « héritable » quand la valeur phénotypique des descendants d'une population est déterminée par leurs parents. La formule  $P = G + E$  valable au niveau d'un individu peut être élargie au niveau d'une population à  $\text{Var}(P) = \text{Var}(G) + \text{Var}(E)$ . Lors du calcul d'héritabilité, c'est donc le facteur  $\text{Var}(G)$  que l'on cherche à évaluer pour chaque caractère, c'est-à-dire la part de la variation phénotypique observée expliquée par la variation génétique. L'héritabilité d'un caractère varie entre 0 (non héritable) à 1 (totalement héritable). On peut poser :

$$h^2_L = \text{Var}(G) / \text{Var}(P), \text{ avec :}$$

- $h^2_L$  = hérabilité au sens large ;
- $\text{Var}(G)$  = variance génétique ;
- $\text{Var}(P)$  = variance phénotypique

### *e) La cartographie de QTL*

Le principe de la détection des QTL est de mettre en relation les données issues du génotypage et du phénotypage grâce à des outils statistiques. Les régions impliquées dans la détermination du phénotype sont localisées sur la carte génétique construite préalablement. Il existe principalement deux méthodes pour localiser un QTL : (i) l'analyse simple marqueur, qui considère les marqueurs un à un ; (ii) la cartographie par intervalle (en anglais IM pour Interval Mapping) qui prend en considération l'intervalle entre deux marqueurs.

#### Analyse simple marqueur

Cette méthode consiste à rechercher une liaison statistique entre le génotype de chaque marqueur et la valeur du caractère quantitatif étudié par une analyse de variance. L'effet de chaque marqueur sur le phénotype est testé systématiquement. De nombreux logiciels de cartographie de QTL utilisent le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis (Lehmann, 1975) pour réaliser cette analyse.

L'avantage de cette méthode réside dans sa simplicité, et dans le fait que l'utilisation d'un logiciel dédié à la cartographie de QTL ne soit pas forcément nécessaire, puisqu'il s'agit seulement d'une analyse de variance que l'on peut réaliser avec l'information génotypique et n'importe quel logiciel de traitement statistique de base.

#### Analyse par cartographie d'intervalle

La cartographie d'intervalle simple (en anglais SIM ou Simple Interval Mapping) a été initiée par Weller en 1987 et reprise par Lander & Botstein en 1989 (Weller, 1987; Lander & Botstein, 1989). Cette analyse consiste dans le calcul de la vraisemblance de l'existence d'un QTL à des points régulièrement espacés au sein d'un intervalle entre deux marqueurs. Cette vraisemblance est déterminée par le LOD (Logarithm of Odds) score, qui constitue la mesure de la significativité du test, en opposant l'hypothèse nulle « absence de QTL » à l'hypothèse alternative de la « présence du QTL ». Le LOD score est défini comme le logarithme base 10 du rapport de vraisemblance de la présence d'un QTL à une position sur l'absence du QTL à cette même position.

Ce calcul est appliqué pour chaque intervalle génétique entre deux marqueurs d'un groupe de liaison donné. Un LOD score de 2 signifie donc que la présence d'un QTL à un endroit donné est 100 fois plus probable que son absence. Il est ainsi possible de tracer une courbe ayant en abscisse les marqueurs d'un groupe de liaison et en ordonnée

le LOD score. Le sommet de la courbe indique alors la localisation la plus probable du QTL, s'il dépasse un seuil de signification fixé préalablement. La puissance de détection et la précision d'un QTL sont d'autant plus fortes que le nombre d'individus dans la population est grand (Darvasi *et al.*, 1993).

La cartographie d'intervalle représente une amélioration de l'analyse simple marqueur, car la position plus probable d'un QTL et la taille de son effet sont estimées de manière plus précise. Néanmoins cette méthode requiert la création préliminaire d'une carte génétique ainsi que l'utilisation d'un logiciel d'analyse QTL spécialisé (MapQTL® par exemple). De plus, les positions indiquées des QTL sont parfois ambiguës, ou influencées par d'autres QTL, et il est parfois difficile de distinguer les effets de QTL trop proches.

En 1993, Zeng a proposé d'introduire des marqueurs adjacents comme co-variables pour réduire les effets des QTL avoisinant (Zeng 1993). Cette méthode, appelée cartographie d'intervalle composite (en anglais CIM ou Composite Interval Mapping) fût complétée par Kao et Zeng en 1999 avec la cartographie d'intervalle multiple (en anglais MIM ou Multiple Interval Mapping) qui permet de prendre en compte les interactions entre les différents QTL et les phénomènes d'épistasie (Kao *et al.* 1999; Zou & Zeng 2008). Ces deux types d'approches sont plus généralement appelés MQM pour Multiple QTL Mapping. Elles constituent une amélioration de la SIM, mais elles requièrent également la création préliminaire d'une carte génétique et un logiciel d'analyse QTL spécialisé. Elles nécessitent en plus d'intensifs calculs informatiques, ce qui rend cette méthode un peu plus lente.

La cartographie de QTL permet d'identifier les régions chromosomiques qui contiennent les facteurs impliqués dans des caractères d'intérêt, et de déterminer des marqueurs moléculaires liés à ces facteurs. Ces connaissances sont un préalable indispensable à la mise en œuvre de programmes d'amélioration variétale.

## **V. La sélection chez la vigne pour la création de variétés résistantes**

### **V.1 Pourquoi faire de la sélection pour la résistance chez la vigne ?**

De nos jours, *V. vinifera* est l'espèce la plus importante sur le marché global de la vigne, produisant la majorité des vins de qualité. Malheureusement, elle est également très sensible à de nombreuses maladies, parmi lesquelles le mildiou et l'oïdium, dont les stratégies de contrôle reposent à l'heure actuelle essentiellement sur l'utilisation de fongicides à haute dose. Cette utilisation massive coûte très cher, mais elle a également des effets très dommageables sur l'environnement et la santé humaine. De plus, on assiste à l'émergence de souches de mildiou et d'oïdium résistantes aux fongicides qui diminuent l'efficacité de ces applications (Steva and Clerjeau, 1990; Gisi *et al.*, 2002; Wilcox *et al.*, 2003; Gisi *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Corio-Costet, 2007; Gisi and Sierotzki, 2008; Baudoin *et al.*, 2008; Furuya *et al.*, 2010).

Depuis plusieurs décennies, les sélectionneurs exploitent la résistance naturelle des vignes sauvages ou apparentées à la vigne cultivée, ou de cultivars particulièrement intéressants, pour réaliser des croisements et sélectionner des hybrides résistants. De manière générale, les programmes de sélection chez la vigne ont pour but de générer des individus qui présentent une haute résistance aux principaux agents pathogènes (ex. mildiou et oïdium), tout en conservant des caractères agronomiques de haut niveau et une bonne adaptation au sol et aux conditions climatiques d'une région de culture particulière. La variabilité génétique existante constitue la ressource principale pour la sélection des candidats appropriés.

### **V.2 L'exploitation des sources naturelles de résistance chez la vigne en sélection**

La variabilité des ressources génétiques représente une matière inestimable en sélection pour le caractère de résistance chez la vigne. Des sources de résistance à *P. viticola* ont été recherchées parmi les *V. vinifera* à plusieurs reprises, et des différences de sensibilité ont été identifiées selon les cultivars (Verderevskij *et al.*, 1965; Li & Doazan, 1986). Mais celles-ci n'ont pas satisfait les exigences pour la production d'une variété résistante (Staudt & Kassemeyer, 1995). Les espèces sauvages résistantes indigènes d'Amérique et d'Asie représentent les meilleures sources de résistance pour la sélection (Espino & Nesbitt, 1982; Zhang *et al.*, 1990). Staudt & Kassemeyer (1995) ont testé la résistance de 107 accessions appartenant à 21 espèces américaines et asiatiques : toutes les accessions de *M. rotundifolia* et de *M. munsoniana*, ainsi que la seule accession de

*V. yenshanensis* testée, ont montré une résistance de haut niveau à *P. viticola*. D'autres accessions ont également été identifiées comme résistantes chez *V. candicans*, *V. doaniana*, *V. piasezkii*, *V. riparia*, *V. rubra*, *V. tiliifolia* et *V. rubra*. Les accessions *V. cinerea*, *V. palmata* et *V. shuttleworthii* ont montré une résistance plus modérée. Cadle-Davidson *et al.* (2008) ont identifié plusieurs sources de résistance au mildiou, parmi lesquelles *V. cinerea*, *V. rupestris*, *V. candicans*, *V. labrusca*. Cependant, malgré le fait que certaines espèces de *Vitis* soient plus résistantes que d'autres en moyenne, la plupart d'entre elles regroupent des accessions à la fois résistantes et sensibles (Cadle-Davidson, 2008).

En ce qui concerne l'oïdium, les résistances spécifiques à certains isolats d'agent pathogène sont répandues parmi les accessions résistantes de *Vitis* (Gadoury & Pearson, 1991). Par exemple, l'hybride interspécifique de *Vitis* cv. Vidal blanc est reporté comme étant hautement résistant à *E. necator* en Allemagne (Stein *et al.*, 1985) mais très sensible à New York (Wilcox *et al.*, 1987). De même, presque toutes les accessions de *V. labrusca* sont résistantes à Geneva (NY) mais sensibles à Fredonia (NY) (Cadle-Davidson, 2010). Des informations sont aussi disponibles sur la sensibilité à l'oïdium d'espèces appartenant plus largement aux *Vitaceae*, comme les *Ampelocissus*, *Cissus* et *Parthenocissus* (Boubals, 1961). En 2011, Feechan *et al.* ont été plus loin en caractérisant l'importance chez les *Vitaceae* de deux facteurs majeurs régulant la sensibilité à l'oïdium, l'efficacité de pénétration et la mort cellulaire programmée induite chez les cellules atteintes : *V. vinifera* et *Ampelopsis brevipedunculata* ont été caractérisés comme sensibles à l'isolat testé ; *Ampelopsis aconitifolia*, *V. riparia* et *V. rupestris* ont montré une résistance partielle ; *M. rotundifolia*, *Cissus antarctica* et *Cissus oblonga* ont montré une résistance associée à une mort cellulaire programmée ; finalement *Cissus rhombifolia*, *Cissus sterculiifolia*, *Parthenocissus tricuspidata* et *Parthenocissus henryana* ont montré une résistance à la pénétration (Feechan *et al.*, 2011).

Les principales sources de résistance au mildiou et à l'oïdium sont donc constituées par les espèces de *Vitis* asiatiques et les espèces nord-américaines, incluant les espèces de *Vitis* américaines et *M. rotundifolia*. Leurs modes de résistance aux agents pathogènes ne sont pas encore totalement connus, mais différents mécanismes de résistance sont probablement impliqués. Les sélectionneurs exploitent déjà ces variétés en les croisant avec *V. vinifera* pour introgresser des facteurs de résistance aux agents pathogènes dans

un fond génétique cultivé sensible. Ils utilisent ainsi la résistance naturelle présente dans ces espèces pour créer des hybrides possédant un bon niveau de résistance aux maladies tout en conservant de bonnes qualités organoleptiques et culturales. Néanmoins il est nécessaire de faire un inventaire le plus complet possible des facteurs de résistance existant pour mieux appréhender la diversité génétique disponible. La compréhension des mécanismes de cette résistance est également un pas fondamental pour l'établissement de stratégies de sélection adaptées.

Dans tout programme de croisement, le choix des génotypes parentaux est crucial. Cependant les programmes de croisements conventionnels sont des processus très longs, surtout pour les espèces ligneuses telles que la vigne. Les outils moléculaires, comme par exemple le développement de marqueurs spécifiques liés aux gènes de résistance, facilitent grandement la sélection des individus intéressants et augmentent la rapidité du processus de création variétale. De plus, la plupart des phénotypes sont le fruit de l'interaction de nombreux gènes, dont les effets ne sont pas toujours immédiatement détectables. Les progrès constants de la biologie moléculaire sont donc à l'heure actuelle d'une grande aide pour compléter cette stratégie, en apportant des outils pour la réalisation d'une sélection précoce des individus parentaux adaptés. La génomique permet l'étude de nombreux gènes simultanément à l'échelle d'un génome. Ainsi, les sélectionneurs utilisent une approche de sélection assistée par marqueurs (SAM) (Gallais, 1993), pour repérer des marqueurs génétiques liés à la présence d'un allèle favorable chez un individu. La SAM offre la possibilité d'une sélection à haut débit des graines ou des jeunes plantes en permettant d'inférer l'héritabilité des caractères d'intérêt à un stade précoce du développement des plantes, et d'analyser simultanément une grande quantité d'échantillons. Les marqueurs moléculaires constituent également un outil pour comprendre le modèle d'héritabilité de la descendance, et donc pour permettre la sélection de la combinaison appropriée d'allèles dérivés des génotypes parentaux (Ribaut & Hoisington, 1998).

La cartographie de gènes ou de QTL de résistance est un préalable nécessaire pour pouvoir utiliser la SAM et augmenter l'efficacité des programmes de sélection.

### **V.3 Les facteurs de résistance au mildiou et à l'oïdium identifiés chez la vigne**

Jusqu'à présent, relativement peu de données ont été publiées concernant les gènes et les QTL impliqués dans la résistance de la vigne au mildiou et à l'oïdium, comparativement à d'autres espèces. Cela s'explique en partie par l'acquisition récente d'information (dernière décennie principalement). De plus obtenir des populations en croisement chez la vigne sur ne serait-ce qu'une ou deux générations est un processus long. L'évaluation phénotypique pour la résistance est souvent une étape critique, dont la reproductibilité est évaluée sur plusieurs années.

#### ***V.3.1 Les facteurs de résistance au mildiou de la vigne***

Plusieurs QTL ont été identifiés, soit à partir d'hybrides provenant de croisements interspécifiques entre différentes variétés ou entre *V. vinifera* et des espèces apparentées (Merdinoglu *et al.*, 2003; Welter *et al.*, 2007; Bellin *et al.*, 2009; Marguerit *et al.*, 2009), soit à partir de l'espèce asiatique *V. amurensis* (Blasi *et al.*, 2011) (Tableau 4 ; Figure 12).

Deux QTL de résistance au mildiou ont été identifiés chez *M. rotundifolia*, à partir d'un pseudo BC1 entre *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon et *M. rotundifolia* cv. Trayshed. Ces QTL ont été nommés *Rpv1* et *Rpv2*, respectivement, et ont été les premiers identifiés à partir de *M. rotundifolia*. Le locus *Rpv1* est situé sur le chromosome 12 et confère une résistance partielle de haut niveau contre *P. viticola* (Merdinoglu *et al.*, 2003). Cette région est riche en analogues de gènes de résistance de type NBS-LRR (Moroldo *et al.*, 2008). Le locus *Rpv2* est situé sur le GL18 (Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006). C'est le seul QTL identifié conférant une résistance totale dans un fond génétique sensible. Cette région est également riche en analogues de gènes de résistance de type NBS-LRR (Di Gaspero *et al.* 2007; Moroldo *et al.* 2008).

En 2009, deux QTL de résistance ont été mis en évidence chez l'espèce américaine *Vitis riparia* cv. Gloire de Montpellier (Marguerit *et al.*, 2009). Ces QTL ont été cartographiés sur les groupes de liaison 9 et 12 d'une carte génétique réalisée à partir du croisement entre *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon et *Vitis riparia*, et expliquent 34,4 et 28,9% de la variance phénotypique totale, respectivement. Ils ont été détectés pour le niveau de résistance général et pour le nombre de sporanges. En considérant ce dernier paramètre, les deux QTL de résistance expliquent ensemble 84,6% de la variance



génétique. Ces auteurs ont également détecté deux QTL supplémentaires sur les groupes de liaison 7 et 15 ayant un LOD score supérieur à 2, mais inférieur au seuil de LOD à  $\alpha = 0,05$ , et expliquant de 13,8 à 16,4% de la variance phénotypique. Le QTL détecté sur le GL12 est situé dans la même région génomique que *Rpv1*.

En 2003, deux QTL de résistance au mildiou avaient déjà détecté à partir de *V. riparia*, sur les groupes de liaison 1 et 8 de la carte réalisée par les auteurs (Marino *et al.*, 2003). Ces groupes de liaison représentent en réalité les groupes 12 et 4 de la nomenclature internationale (Grando *et al.*, 2003; Adam-Blondon *et al.*, 2004). Puisque la carte de Marino *et al.* (2003) a été construite avec des marqueurs AFLP absents sur les autres cartes génétiques, Marguerit *et al.* (2009) n'ont pas pu confirmer que les QTL détectés dans leur étude se trouvaient au même endroit que ceux de Marino *et al.* (2003).

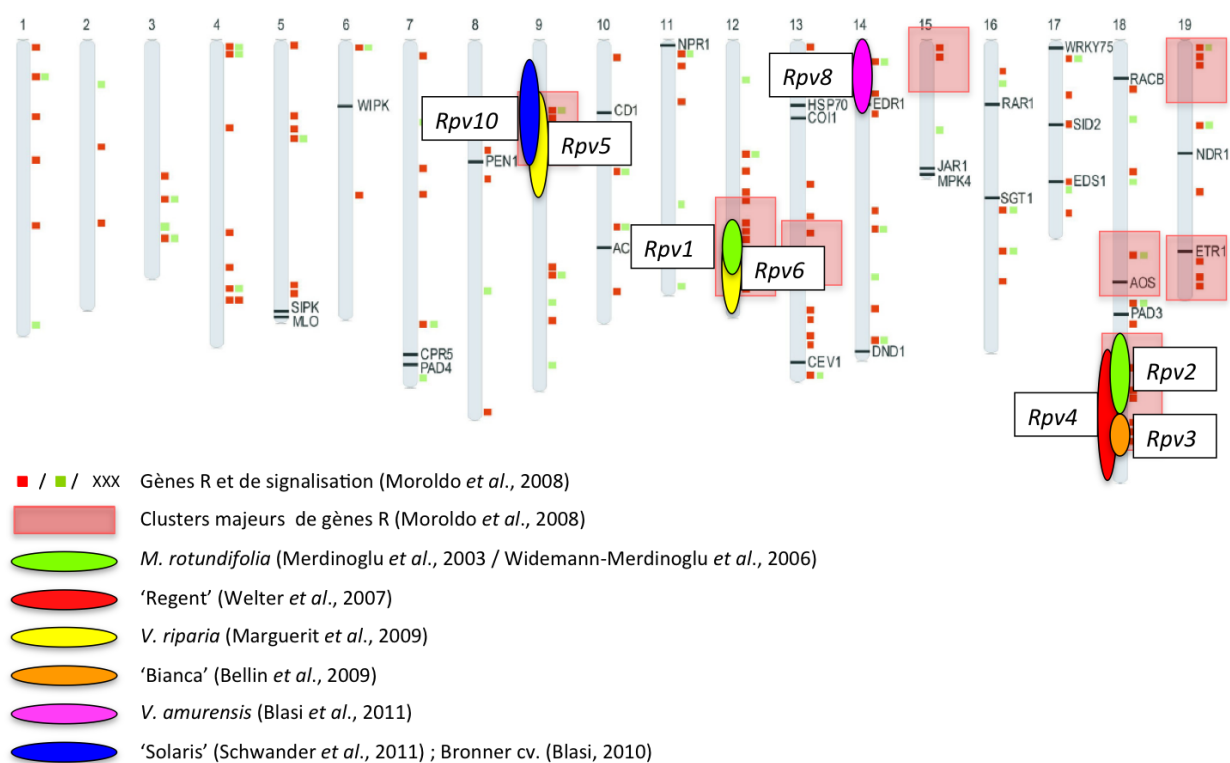
Des QTL de résistance au mildiou ont également été identifiés à partir de la variété de vigne 'Regent'. Cette variété a été produite à l' « Institute for Grapevine Breeding » du Geilweilerhof (Allemagne) et montre une résistance au mildiou et à l'oïdium.

En 2004, une carte génétique a été réalisée à partir d'une population F1 provenant d'un croisement entre le cultivar résistant 'Regent' et le cultivar sensible traditionnel 'Lemberger' (Fischer *et al.*, 2004). Un QTL majeur de résistance au mildiou a été localisé sur le GL18 de la nomenclature internationale (Adam-Blondon *et al.*, 2004). Ce QTL a été identifié en analysant les données phénotypiques obtenues sur trois ans de notations de symptômes réalisées au vignoble sur baies et sur feuilles, et expliquent jusqu'à 70% de la variation phénotypique. De plus, un autre QTL mineur de résistance à *P. viticola* sur feuilles a été détecté sur le GL 5.

En 2007, Welter *et al.* (2007) ont amélioré la carte génétique de Fisher *et al.* (2004) en fournissant trois années supplémentaires d'évaluations phénotypiques (Welter *et al.*, 2007). Un nouveau QTL à effet majeur ainsi qu'un QTL à effet mineur ont été identifiés. Le QTL majeur, situé sur le GL 18, a été détecté pour le niveau de résistance des feuilles, des baies et la taille de lésions pendant 4 années d'observations en champ. Ces résultats sont cohérents avec les descriptions précédentes de Fischer *et al.* (2004). Néanmoins, le QTL ayant la valeur de LOD score maximale explique jusqu'à 37,3% de la variance phénotypique seulement, et l'intervalle de confiance du QTL est large, donc peu précis. Welter *et al.* (2007) ont donc émis l'hypothèse que plus d'un facteur de résistance étaient probablement impliqués dans la résistance à cette région génomique.

Locus de résistance	Source génétique	Localisation génomique	Littérature
<i>Rpv 1</i>	<i>M. rotundifolia</i> cv. Trayshed	Chromosome 12	Wiedemann-Merdinoglu, 2006
<i>Rpv 2</i>	<i>M. rotundifolia</i> cv. Trayshed	Chromosome 18	Wiedemann-Merdinoglu, 2006
<i>Rpv 3</i>	variété Bianca	Chromosome 18	Bellin <i>et al.</i> , 2009
<i>Rpv 4</i>	variété Regent	Chromosome 18	Fisher <i>et al.</i> , 2004 Welter <i>et al.</i> , 2007
<i>Rpv 5</i>	<i>V. riparia</i> Gloire de Montpellier	Chromosome 9	Marguerit <i>et al.</i> , 2009
<i>Rpv 6</i>	<i>V. riparia</i> Gloire de Montpellier	Chromosome 12	Marguerit <i>et al.</i> , 2009
<i>Rpv 8</i>	<i>V. amurensis</i>	Chromosome 14	Blasi <i>et al.</i> , 2011
<i>Rpv 10</i>	variété Solaris	Chromosome 9	Schwander <i>et al.</i> , 2011

**Tableau 4.** Inventaire des QTL de résistance au mildiou publiés à ce jour. Les QTL *Rpv4*, *Rpv5* et *Rpv6* ont été renommés ainsi après leur publication (<http://www.vivc.de>).



**Figure 12.** Localisation chromosomique et origine des QTL de résistance au mildiou sur le génome de la vigne (carte physique d'après Moroldo *et al.*, 2008).

Le QTL mineur a quant à lui été localisé sur le GL 4. Malgré son effet « faible », il explique jusqu'à 22,6 % de la variance phénotypique et a pu être détecté durant les 4 années d'évaluation. Le QTL du GL 5 de Fisher *et al.* (2004) n'a pas pu être confirmé.

Il est intéressant de noter que le pedigree de 'Regent' inclue potentiellement jusqu'à sept espèces sauvages de *Vitis* différentes, dont *V. riparia*. L'origine des facteurs de résistance au mildiou présents dans ces cultivars n'est pas encore pleinement élucidé, mais les résultats de Maguerit *et al.* (2009) et Welter *et al.* (2007) tendent à démontrer que les QTL de résistance au mildiou détectés chez *V. riparia* sont différents de ceux identifiés chez 'Regent' et n'ont donc pas été introgressés dans ce cultivar résistant.

Des QTL de résistance au mildiou ont été mis en évidence dans la variété 'Bianca', un croisement entre la variété 'Villard Blanc', qui résulte lui-même de plusieurs cycles de rétrocroisement entre des ancêtres nord-américains résistants et des cultivars sensibles de *V. vinifera*, et la variété 'Bouvier', un pur *V. vinifera*. Bellin *et al.* (2009) ont décrit chez Bianca un QTL situé en aval de *Rpv2*, dans la partie distale du chromosome 18. Ce locus confère une résistance partielle de haut niveau et explique par exemple jusqu'à 74,6% de la variance phénotypique pour la densité des sporangiophores. Ce locus, appelé *Rpv3*, chevauche celui identifié sur les GL18 pour la résistance des feuilles et des baies par Fisher *et al.* (2004) et Welter *et al.* (2007) chez 'Regent'. La position imprécise du pic du QTL *Rpv3* selon les différentes années d'observation ainsi que le large intervalle de confiance de ce dernier ont conduit les auteurs à présumer que plusieurs gènes fonctionnels pourraient résider dans le locus *Rpv3*. Néanmoins une souche de mildiou a récemment été identifiée comme « contournante » chez 'Bianca' (Peressotti *et al.*, 2010), et des résultats récents montrent que cette souche particulière contourne également le QTL de résistance du GL18 de 'Regent' (Blasi, 2010). Ces résultats suggèrent fortement que le même facteur génétique gouverne les deux variétés résistantes 'Bianca' et 'Regent'.

La projection des séquences des marqueurs entourant l'intervalle de confiance de *Rpv3* et de *Rpv2* sur la séquence du génome de la vigne (Jaillon *et al.*, 2007) permet d'identifier deux régions séparées approximativement par 1,5 Mbp sur le chromosome 18. A la résolution apportée par les populations de cartographie disponibles à l'heure actuelle, Bellin *et al.* (2009) ont estimé qu'il était difficile de savoir si *Rpv3* sous-tendait un gène de résistance différent et pouvait être cartographié génétiquement séparément de *Rpv2*, s'il s'agissait d'un QTL allélique, ou encore si les gènes sous-jacents, étaient

liés sur une très courte distance physique. Néanmoins la résistance conférée par *Rpv2* reste totalement active face à la souche contournante de *Rpv3* (Blasi, 2010), ce qui suggère cette fois qu'il s'agit bien de deux facteurs de résistance distincts.

En plus de *Rpv3* identifié sur le chromosome 18, un QTL mineur a été détecté sur le GL7 de 'Bianca' (Bellin *et al.*, 2009), et explique jusqu'à 12,1% de la variance phénotypique pour la variation de la densité des sporangiophores. Marguerit *et al.* (2009) ont également trouvé un QTL mineur sur le GL 7 de *V. riparia*, mais il n'a pas été localisé plus précisément dans l'article. Puisque *V. riparia* est absent de la généalogie du 'Villard Blanc', rien ne nous permet d'étayer le fait que les deux QTL pourraient n'être qu'un seul et même locus. L'hypothèse selon laquelle le GL7 porte des facteurs de résistance qui, même de façon mineure, peuvent renforcer la capacité de ces accessions à résister efficacement au mildiou, reste plausible.

Un QTL majeur et un mineur ont été mis en évidence sur les GL9 et 19 respectivement, chez le cultivar 'Bronner' (Blasi, 2010). Il s'agit d'une variété de vigne cultivée à raisin blanc, qui est un hybride complexe entre les deux espèces américaines *V. rupestris* et *V. lincecumii*, l'espèce asiatique *V. amurensis* et *V. vinifera*. La résistance de 'Bronner' au mildiou est partielle mais de haut niveau. Le QTL majeur du GL9 est situé à proximité du marqueur VMC6d12, et son intervalle de confiance chevauche celui du QTL identifié par Marguerit *et al.* (2009) chez *V. riparia*.

En 2011, Schwander *et al.* (2011) ont identifié un nouveau QTL de résistance au mildiou dans le cultivar 'Solaris', hybride complexe entre des variétés américaines, *V. amurensis* et *V. vinifera*. Ce QTL, localisé également sur le GL9, a été appelé *Rpv10* et colocalise avec le QTL identifié par Marguerit *et al.* (2009) chez *V. riparia*. La résistance de *Rpv10* est originaire du parent *V. amurensis*. Si Schwander *et al.* (2011) émettent l'hypothèse que le QTL de résistance du GL9 pourrait être identique entre les cultivar 'Bronner' (Blasi, 2010) et 'Solaris' (Schwander *et al.*, 2012), un autre facteur interviendrait dans le QTL de Marguerit *et al.* (2009).

Enfin en 2011, Blasi *et al.* ont localisé un QTL de résistance au mildiou à partir de *V. amurensis*. Ce QTL, situé sur le GL14, a été identifié dans la descendance d'une autofécondation de *V. amurensis* cv. Ruprecht. Ce QTL, appelé *Rpv8*, explique 86,3% de la variance phénotypique globale, soit 100% de la variance génétique en considérant l'héritabilité estimée à 86,2% (Blasi *et al.*, 2011).

Ces résultats, ajoutés à ceux de Schwander *et al.* (2011) semblent montrer que la résistance au mildiou au sein de l'espèce *V. amurensis* peut selon les accessions être due à des facteurs situés sur des chromosomes différents.

### ***V.3.2 Les facteurs de résistance à l'oïdium de la vigne***

Même s'il existe moins de données quantitatives que pour le mildiou, deux gènes ainsi que plusieurs QTL de résistance à l'oïdium ont été identifiés à ce jour, à partir de différentes ressources génétiques ou hybrides inter-spécifiques (Tableau 5 ; Figure 13).

Un gène de résistance a été identifié par Hoffmann *et al.* (2008) à partir d'un *V. vinifera* originaire d'Europe de l'est, la variété hongroise 'Kishmish vatkana'. Ce gène a été nommé *Ren1* (pour Resistance to *E. necator* 1). La résistance apportée par *Ren1* est partielle mais de haut niveau, elle permet la formation d'un tube germinatif et d'un appressorium mais supprime le développement des hyphes et la production de conidiophores chez l'agent pathogène. L'action de *Ren1* porte sur la défense de type ETI (Hoffmann *et al.*, 2008).

Le gène de résistance à l'oïdium *Run1* (pour Resistance to *Uncinula necator* 1, ancien nom d'*E. necator*) a quant à lui été identifié en 2001 à partir de *M. rotundifolia* cv. G52 (Pauquet *et al.*, 2001; Donald *et al.*, 2002; Barker *et al.*, 2005). La résistance de *Run1* a été décrite comme totale. Ce gène provoque une réaction de type HR avec la mort cellulaire programmée apparaissant 24 à 48h après la contamination dans les cellules épidermiques jouxtant le site d'infection. Son action porte donc, comme pour *Ren1*, sur la défense de type ETI. *Run1* colocalise avec le QTL de résistance au mildiou *Rpv1* (Wiedemann-Merdinoglu *et al.* 2006). Très récemment, les gènes responsables de la résistance *Run1* et *Rpv1* ont pu être clonés (Pere Mestre, INRA, Colmar, communication personnelle) : il s'agit de deux gènes indépendants mais situés dans le même cluster de gènes NBS-LRR. A ce jour, ce sont les deux seuls gènes de résistance au mildiou et à l'oïdium clonés chez la vigne.

Récemment, Riaz *et al.* (2011) ont identifié deux QTL de résistance à l'oïdium sur le chromosome 18 de *M. rotundifolia*. Ces QTL, appelés *Run2.1* et *Run2.2* proviennent respectivement de *M. rotundifolia* cv. Magnolia et *M. rotundifolia* cv. Trayshed (Riaz *et al.*, 2011). Ces QTL se chevauchent mais des marqueurs moléculaires distincts ont été identifiés pour permettre leur introgression en sélection. Le mécanisme d'action de ces QTL est par contre encore en cours d'évaluation.

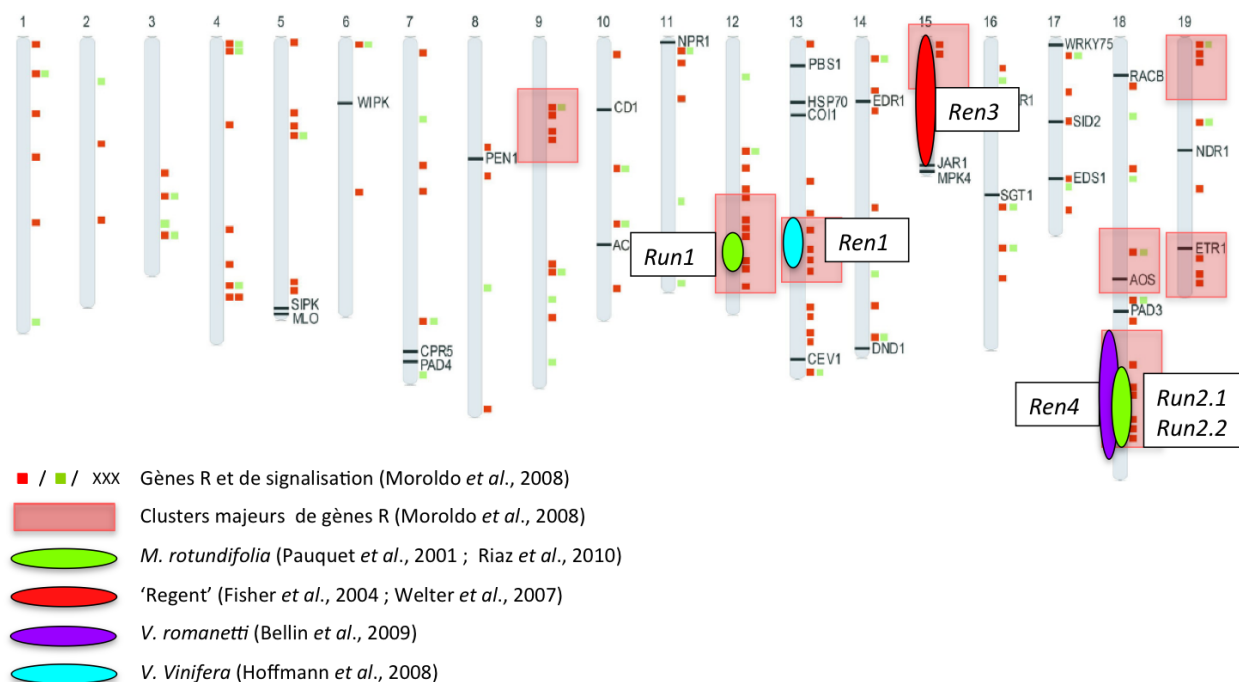
Dalbo *et al.* (1998) ont identifié un QTL de résistance à l'oïdium chez l'espèce américaine *V. cinerea*, à partir d'une carte génétique construite à l'aide de marqueurs AFLP et RAPD issue d'un hybride entre les espèces américaines *V. rupestris* et *V. cinerea* (Dalbó, 1998; Dalbó *et al.*, 2001). Ce QTL, nommé a posteriori *Ren2*, porte un gène ou un cluster de gènes majeurs (Dalbó *et al.*, 2001) localisé sur le chromosome X de la carte génétique du parent résistant. Malheureusement cette carte ayant été réalisée avec des marqueurs AFLP et RAPD, qui sont absents des cartes de référence actuelles principalement constituées de marqueurs microsatellites, il est très difficile d'établir une correspondance des chromosomes.

Le nom *Ren3* a été attribué au QTL identifié à partir d'hybrides de 'Regent', 'Villard Blanc' ou 'Gf.Ga-47-42' (Fischer *et al.*, 2004; Akkurt *et al.*, 2007; Welter *et al.*, 2007). *Ren 3*, dont l'origine de la résistance provient de 'Regent', est situé sur le GL 15 du génome de la vigne, et montre des effets significatifs sur la résistance des feuilles et des baies, expliquant respectivement jusqu'à 56,8% et 64,5% de la variance phénotypique.

Plusieurs espèces de *Vitis* d'origine asiatique ont été testées pour leur résistance à l'oïdium (Wang *et al.*, 1995; Wan *et al.*, 2007). Elles ont montré de bons niveaux de résistance, indiquant la présence de facteurs de résistance sous-jacents. Pour le moment, un QTL de résistance a été formellement identifié sur le GL18 à partir de l'espèce asiatique *V. romanetti* (Ramming *et al.* 2011; Riaz *et al.* 2011). Ce QTL, nommé *Ren4*, chevauche *Run2.1* et *Run2.2* au sein du grand cluster de gènes NBS-LRR situé dans cette région du génome. La résistance de *Ren4* est dominante, presque complète et rapide, elle est indépendante d'une HR. Ramming *et al.* (2011) proposent que la résistance apportée par *Ren4* serait davantage due à la PTI qu'à l'ETI.

Locus de résistance	Source génétique	Localisation génomique	Littérature
<i>Run 1</i>	<i>M. rotundifolia</i> cv. G52	Chromosome 12	Pauquet <i>et al.</i> , 2001 Donald <i>et al.</i> , 2002 Barker <i>et al.</i> , 2005
<i>Ren 1</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Kishmish vatkana	Chromosome 13	Hofmann <i>et al.</i> , 2008
<i>Ren 2</i>	<i>V. cinerea</i>	Chromosome X, carte Illinois 547-1	Dalbo <i>et al.</i> , 2001
<i>Ren 3</i>	Variétés Regent, Villard Blanc & Gf.Ga-47-42	Chromosome 15	Fisher <i>et al.</i> , 2004 Akkurt <i>et al.</i> , 2007 Welter <i>et al.</i> , 2007
<i>Ren 4</i>	<i>V. romanetti</i>	Chromosome 18	Ramming <i>et al.</i> , 2010 Riaz <i>et al.</i> , 2010
<i>Run 2.1</i>	<i>M. rotundifolia</i> cv. Magnolia	Chromosome 18	Riaz <i>et al.</i> , 2010
<i>Run 2.2</i>	<i>M. rotundifolia</i> cv. Trayshed	Chromosome 18	Riaz <i>et al.</i> , 2010

**Tableau 5.** Inventaire des QTL et gènes de résistance à l'oïdium publiés à ce jour.



**Figure 13.** Localisation chromosomique et origine des QTL de résistance à l'oïdium sur le génome de la vigne (carte physique d'après Moroldo *et al.*, 2008).

### **V.4 La durabilité, un enjeu majeur dans la création de nouvelles variétés résistantes**

Lors de l'établissement de stratégies de croisement pour la sélection de variétés résistantes, l'une des préoccupations principales est la question de la durabilité de la (des) résistance(s) introduite(s).

Pour la plupart des caractères d'intérêt agronomique, une relative stabilité dans le temps est observée chez les plantes. La résistance aux maladies obtenue à l'aide de gènes de résistance peut quant à elle subir, au cours du temps, une perte d'efficacité liée à l'apparition de nouvelles souches d'agents pathogènes capables d'infecter des variétés initialement résistantes. De plus, les facteurs de résistance identifiés à ce jour dans les ressources génétiques de vigne constituent une ressource limitée. Il est donc indispensable de définir des règles d'exploitation des sources de résistance actuellement à notre disposition pour maximiser leur pérennité, et par conséquent la durabilité des résistances introduites.

Mais la première question qui se pose est : « comment définir la notion de durabilité ? » Une résistance est dite durable « lorsqu'elle reste efficace dans une variété cultivées sur de grandes surfaces, pendant une longue période de temps, et dans des conditions favorables au développement de la maladie » (Johnson, 1981). La durabilité des résistances aux bioagresseurs est conditionnée par de nombreux facteurs tels que la plante en elle-même (gènes de résistance, combinaison de gènes), les caractéristiques de l'agent pathogène, le peuplement des souches (variétés, associations de variétés), ou l'agrosystème (gestion spatio-temporelle des variétés, pratiques culturales et itinéraires techniques, etc). Malgré le faible nombre de pathosystèmes pour lesquels des évaluations quantifiées de la durabilité des résistances sont disponibles, quelques éléments peuvent néanmoins être dégagés pour la prédire :

- L'association de gènes à effet majeur et de facteurs quantitatifs à effet partiel permet d'augmenter sensiblement la durabilité de la résistance. Les gènes majeurs de résistance impliqués dans les interactions de type gène pour gène sont facilement contournés dans un fond génétique sensible, mais voient leur durabilité fortement augmentée dans un fond génétique partiellement résistant (Palloix *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010). Un indicateur de prédiction de durabilité est donc la nature oligo- ou polygénique de la résistance. Par ailleurs, la durabilité apparaît être dépendante des propriétés intrinsèques des différents



gènes ainsi que de leur combinaison. En sélection, il sera *a priori* préférable de cumuler des gènes à large spectre d'action (généralistes), plutôt que des gènes à spectre d'action étroit (spécifiques), et de combiner différents mécanismes d'action.

- Les caractéristiques biologiques de l'agent pathogène sont d'une importance majeure dans la durabilité d'une résistance, car plusieurs facteurs peuvent déterminer son potentiel évolutif : la taille des populations, les flux de gènes, ou encore les systèmes de reproduction, par exemple (McDonald & Linde, 2002).
- La résistance gène pour gène résulte de l'interaction entre le produit d'un gène de résistance de la plante et celui d'un gène d'avirulence de l'agent pathogène. Les paramètres biologiques et les mécanismes moléculaires qui régissent cette interaction peuvent également expliquer des variations dans la durabilité des résistances. Il existe notamment ce qu'on appelle un « coût de la virulence » pour l'agent pathogène : le contournement d'un gène de résistance peut en effet se traduire par l'émergence et la diffusion plus lente des souches virulentes au sein de la population de l'agent pathogène. De plus, le nombre d'événements mutationnels nécessaires pour acquérir la virulence, ainsi que les pressions sélectives exercées sur les substitutions d'acides aminés dans les facteurs d'avirulence, sont autant de facteurs pouvant influencer la durabilité de la résistance (Janzac *et al.*, 2009).

Une solution pour augmenter le niveau de résistance des plantes, et obtenir des variétés à résistance durable pour limiter les risques de contournement, est donc de pyramider plusieurs gènes de résistance, soit par SAM (Tan *et al.*, 2010) soit par transgénèse, soit par cisgénèse comme chez la pomme de terre (Haverkort *et al.*, 2008; Jacobsen & Schouten, 2008). En effet, le risque de contournement est élevé si les gènes de résistance sont utilisés indépendamment les uns des autres. La source de résistance portée par la variété de vigne 'Bianca', *Rpv3* (Figure 12) a ainsi déjà été contournée par une souche de mildiou (Peressotti *et al.*, 2010).

Une autre solution consiste à exploiter la résistance quantitative des sources de résistance disponibles, soit seule, soit en combinaison avec des gènes R (Solomon-Blackburn *et al.*, 2007). Zhang *et al.* (2009) suggèrent ainsi que l'introduction dans un cultivar de laitue des trois QTL de résistance récessifs *rbq4*, *rbq5*, et *rbq6+11*, identifiés

chez la laitue sauvage, conduit à une résistance durable et efficace contre *B. lactucae*, l'agent du mildiou chez cette espèce.

### **VI. Le contexte et les objectifs de la thèse**

*Muscadinia rotundifolia* est une espèce possédant une résistance de très haut niveau au mildiou et à l'oïdium, mais également à d'autres bio-agresseurs de la vigne (*Xiphinema index*, phylloxéra, maladie de Pierce). En revanche, son utilisation en sélection est rendue délicate de part sa faible interfertilité avec *V. vinifera*. Il est probable que la distance génétique séparant ces deux espèces, qui possèdent un nombre chromosomique différent ( $2n=38$  pour *V. vinifera* vs  $2n=40$  pour *M. rotundifolia*), impacte sur les possibilités de recombinaison entre les deux génomes. La connaissance de l'organisation génétique et génomique de *M. rotundifolia* permettra l'identification de nouveaux facteurs de résistance chez cette espèce, utilisables en sélection variétale, et à terme d'optimiser l'exploitation de ces facteurs dans les programmes d'amélioration génétique de la vigne.

Mon projet de thèse se penche plus particulièrement sur l'étude la résistance issue de *M. rotundifolia*, avec le but finalisé d'apporter des éléments contribuant à la création de variétés à résistance durable.

Ainsi, les objectifs principaux de ma thèse sont les suivants :

- 1- Analyser les différences structurales entre les génomes de *M. rotundifolia* et de *V. vinifera*
- 2- Identifier de nouveaux facteurs de résistance au mildiou et à l'oïdium chez *M. rotundifolia*, utilisables à terme en sélection

Pour cela, une carte génétique de *M. rotundifolia* cv. Regale a tout d'abord été réalisée, et comparée avec les données disponibles à l'heure actuelle pour *V. vinifera*. Puis une population issue de l'autofécondation de ce cultivar a été analysée vis à vis de sa résistance au mildiou et à l'oïdium, pour rechercher les facteurs qui en sont à l'origine.



PARTIE A :  
CONSTRUCTION D'UNE  
CARTE GENETIQUE DE  
*MUSCADINIA ROTUNDIFOLIA*



## **PARTIE A : CONSTRUCTION D'UNE CARTE GENETIQUE DE *MUSCADINIA ROTUNDIFOLIA***

### **I. Contexte général**

#### **I.1 Historique de la cartographie génétique chez la vigne**

Durant la dernière décennie, une grande quantité d'information génétique est devenue accessible chez la vigne à la communauté scientifique pour le genre *Vitis*, incluant plusieurs cartes génétiques obtenues à partir de différents fonds génétiques : des croisements intra-spécifiques de *V. vinifera* (Doligez *et al.*, 2002; Adam-Blondon *et al.*, 2004; Riaz *et al.*, 2004; Doligez *et al.*, 2006; Troggio *et al.*, 2007), une descendance issue de l'autofécondation de *V. amurensis* (Blasi *et al.*, 2011) et des hybrides produits à partir de croisements inter-spécifiques (Lodhi *et al.*, 1995; Dalbó *et al.*, 2000; Grando *et al.*, 2003; Doucleff *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2004; Lowe & Walker, 2006; Welter *et al.*, 2007; Di Gaspero *et al.*, 2007; Salmaso *et al.*, 2008; Bellin *et al.*, 2009; Marguerit *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2010). Une carte physique de *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon a été construite par Moroldo *et al.* (2008). D'autre part, le génome de la vigne est séquencé depuis 2007 (Jaillon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007). Deux séquences sont disponibles : la première réalisée à partir de l'individu PN40024, issu d'autofécondations successives de Pinot Noir, de couverture 12X (Jaillon *et al.*, 2007 ; (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>), la seconde réalisée sur le Pinot Noir Clone n°115, de couverture 6,4X (Velasco *et al.*, 2007 ; <http://genomics.research.iasma.it/gb2/gbrowse/grape/>). Ainsi, la vigne *V. vinifera* L. est la quatrième plante dont le génome a été entièrement décrypté, après l'arabette, le riz et le peuplier.

#### **I.2 Contexte et objectifs de la construction d'une carte génétique chez la muscadine**

Cette partie de la thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet qui s'attache à réaliser la génomique comparative de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* et l'analyse de la résistance aux maladies chez *M. rotundifolia*. Son objectif finalisé principal est d'accélérer la caractérisation fonctionnelle de la résistance aux maladies de la vigne chez *M. rotundifolia*. Pour cela, une étape essentielle est le développement préalable de ressources pour l'analyse et l'exploitation de la synténie entre *V. vinifera* et *M.*

*rotundifolia*. La synténie peut être définie comme la colocalisation physique de loci génétiques et/ou de gènes sur le même chromosome et/ou groupe de liaison entre individus ou espèces (Abrouk *et al.*, 2010). La connaissance de la synténie est importante, car elle permet d'identifier les régions orthologues entre espèces, et d'étudier la dynamique des génomes en identifiant des réarrangements (transpositions, délétions, insertions, inversions, fusions/fissions), donc de reconstruire les événements qui ont amené à la formation des caryotypes.

La réalisation d'une carte génétique de *M. rotundifolia* est l'étape nécessaire requise pour étudier la synténie entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia*, analyser les bases génétiques de la résistance de la muscadine au mildiou et à l'oïdium de la vigne, puis à terme utiliser de façon optimale les facteurs de résistance de *M. rotundifolia* en sélection. Cette partie de mon manuscrit présente la construction de la première carte génétique de *M. rotundifolia*, construite à l'aide de marqueurs microsatellites.

## II. Matériel et Méthodes

### II.1 Matériel végétal : obtention de la population de cartographie

La population de cartographie utilisée dans ce travail, appelée '42055', est issue d'une autofécondation (en anglais selfing ou S1) réalisée en 2006 à partir de *Muscadinia rotundifolia* cv. Regale, accession hermaphrodite maintenue en collection à l'INRA de Colmar, France. Les pépins de la population '42055' ont été semés sur un substrat de laine de roche en petits blocs. Après la germination des pépins, les plantules ont été cultivées en serre sur pain de laine de roche, avec apport d'une solution nutritive complète (4.8% Norsk Hydro Hydrokani CPO, YARA) dans l'eau d'arrosage.

La population est composée de 191 individus, maintenus en serre en pots de 4L contenant un mélange de terreau et de perlite et arrosés avec un complément d'engrais (figure 14). Les plantes ont été taillées sur deux yeux en hiver, la reprise végétative permettant un développement uniforme des plantes.



**Figure 14.** Les individus de la population '42055' sont maintenus en serre, à raison d'un pot par génotype.



## **II.2 Extraction d'ADN**

L'ADN génomique des 191 individus ainsi que du parent de la population '42055' a été extrait à l'aide du Kit d'extraction Qiagen DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). Quatre-vingt à 100 mg de jeunes feuilles vernissées ont été prélevées et broyées à l'azote liquide pendant 30 s à 30 Hz à l'aide du broyeur à tubes Retsch®. Du PVP a été ajouté au tampon d'extraction fourni avec le Kit (10mg de PVP30 par échantillon) : le PVP absorbe particulièrement bien les polyphénols et permet donc d'obtenir en fin d'extraction des ADN présentant une bonne pureté avec de meilleurs rendements. La muscadine est en effet naturellement riche en polyphénols, ce qui peut altérer le rendement d'ADN extrait. De plus les polyphénols peuvent désactiver des protéines et donc inhiber des réactions ultérieures comme la PCR.

## **II.3 Amplification de microsatellites et détection du polymorphisme**

Les marqueurs moléculaires utilisés pour détecter du polymorphisme dans la population '42055' et construire une carte génétique sont des marqueurs microsatellites (ou SSR). Il s'agit de motifs constitués de répétitions de 2 ou 3 nucléotides généralement, répétitions dont le nombre est extrêmement variable entre individus.

Ces marqueurs, répartis sur l'ensemble du génome, sont amplifiés par PCR à l'aide de couples d'amorces spécifiques. L'une des amorces de chaque couple est marquée avec un fluorochrome, grâce auquel les échantillons sont détectés lors de leur migration sur un séquenceur capillaire.

### ***II.3.1 Amorces microsatellites***

Des paires d'amorces spécifiques ont été employées pour amplifier des loci microsatellites appartenant aux jeux de marqueurs suivants : VVS (Thomas & Scott, 1993), VVMD (Bowers *et al.*, 1996, 1999), VrZAG (Sefc *et al.*, 1999), VMC (Vitis Microsatellite Consortium, Agrogene, Moissy Cramayel, France), UDV (Di Gaspero *et al.*, 2005), VVI (Merdinoglu *et al.*, 2005), VrG (Regner *et al.*, 2006), VVCS et SC8 (Cipriani *et al.*, 2011), ainsi que Chr7V003, Chr7V004 et Chr14V015 (Blasi *et al.*, 2011). Plusieurs amorces ont également été nouvellement développées afin d'enrichir les chromosomes 7 et 14 (Tableau 6).

PARTIE A

Nom du marqueur	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Localisation sur la carte
Chr7V013	Chr14V013F	TCCAATTTTCCCAAACAA	GL7
	Chr14V013R	AAAAAGGTTTTATTATGTGGCATT	
Chr7V014	Chr14V014F	TGACTGCAGCTTTGGATTTG	GL7
	Chr14V014R	TTTTTAGATTTAAGCGGAGTGGA	
Chr7V016	Chr14V016F	AAAAATTAAAGAAAATCGATGAGAAGA	GL7
	Chr14V016R	TTTTTATGAATGGATGGATTTTG	
Chr7V018	Chr14V018F	CTTTGGTTCGTCCGATTTAT	GL7
	Chr14V018R	AAGGCACAAGAGAAATTGACC	
Chr7V020	Chr14V020F	CGGGTTAGGCGAACTCAAGCCC	GL7
	Chr14V020R	ACGCAGCCCTACCACCCTGT	
Chr7V023	Chr14V023F	GCCGGCCTGCAATGGGATTAC	GL7
	Chr14V023R	CGCGAATACCAGGACACCCC	
Chr7V026	Chr14V026F	TCTGGTTTGGTGGGAGTTTT	GL7
	Chr14V026R	GGGCCCGCTTATTGTAATCT	
Chr14V041*	Chr14V041F	CAACCAAGGGTTGACCTTTTT	GL14
	Chr14V041R	TTGCTCGAGTTGTTTCAAGC	
Chr14V048*	Chr14V048F	CAGAATCCAATGGCCTTTCA	GL14
	Chr14V048R	AAGGCAGGAACCCATTCATA	
Chr14V054*	Chr14V054F	TCAAACAGCCCTTGAACCTC	GL14
	Chr14V054R	CTGAACCTCAAGCCCTCAAC	
Chr14V056*	Chr14V056F	ATTTGGCCAACCAATCAAAA	GL14
	Chr14V056R	GCCAAACACACCCAAGAAAA	
Chr14V058	Chr14V058F	AAAATGAAACCCGCAACAAG	GL14
	Chr14V058R	GCTCGTGCCTTAGGTTTGAC	
Chr14V060	Chr14V060F	GGATTGGACAGGCATACTGG	GL14
	Chr14V060R	TGTTCAATTGGTTCAACTTCCA	

**Tableau 6.** Nouveaux marqueurs microsatellites développés dans ce travail et intégrés à la carte génétique de *M. rotundifolia*. Source des amorces notées \* : Paule Blasi (communication personnelle).

### II.3.2 Amplifications PCR

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume final de 8µl, dont 1µl d'ADN dilué à 10ng/µl. Au tampon PCR 1X sont ajoutés du MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, une solution de dNTP 150µM et la Taq Polymerase Gold 0,025U/µl. Chaque amorce est diluée à 10µM. Une amorce par couple est marquée avec un fluorochrome FAM<sup>TM</sup> (bleu), HEX<sup>TM</sup> (vert) ou NED<sup>TM</sup> (jaune).

Les conditions d'amplification utilisées sont les suivantes :

Dénaturation : 5 minutes à 94°C	}	14 cycles
Dénaturation : 20 secondes à 94°C		
Hybridation : 20 secondes à 65°C		
Diminution de -1°C par cycle (Touchdown)		
Elongation : 40 secondes à 72°C	}	35 cycles
Dénaturation : 20 secondes à 94°C		
Hybridation : 20 secondes à 65°C		
Elongation : 40 secondes à 72°C		
Extension terminale : 7 minutes à 72°C		

### II.3.2 Séparation des produits PCR par électrophorèse capillaire

Des groupes de produit PCR ont été constitués afin d'analyser plusieurs produits d'amplification en même temps. Pour pouvoir être correctement différenciés, les produits PCR doivent différer par leur fluorochrome et/ou la taille en paire de bases du fragment amplifié. Les SSR ont été séparés en 4 catégories en fonction de la taille de l'amplifiat : 1 (0-100pb), 2 (100-200pb), 3 (200-300pb) et 4 (300pb). Sachant que 3 types de fluorochromes différents sont utilisés, jusqu'à 12 produits PCR différents peuvent être mélangés dans un même puits. Cette technique de chargement multiple est communément appelée le « multiloadage ».

1µl de produit PCR (ou de mélange de produits PCR) est ensuite associé à 18,8µl de formamide et 0,2µl de marqueur de taille (HD400-ROX<sup>TM</sup>, Applied Biosystems).

Après une dénaturation de 3 minutes à 92°C, les échantillons migrent en condition dénaturante sur un séquenceur ABI PRISM 310 (Polymère POP-4, Applied Biosystems, Colmar, France), ou ABI PRISM 3100 ou 3730xl (Polymère POP-7, Applied Biosystems, Clermont-Ferrand, France). Les résultats de ces migrations sont ensuite analysés avec le logiciel Genotyper<sup>TM</sup> 2.5.2 (Applied Biosystems).

#### II.4 Construction de la carte génétique

Les marqueurs moléculaires ont été liés génétiquement entre eux grâce au logiciel JoinMap®3.0 (Van Ooijen & Voorrips, 2001), capable d'analyser les populations issues de l'autofécondation d'un parent hétérozygote (similaire à un type F2) et de construire une carte de liaison génétique. Les distances génétiques ont été calculées avec la fonction de Kosambi (Kosambi, 1944). La valeur seuil de LOD pour la constitution d'un groupe de liaison a été fixée à 4, avec une fréquence de recombinaison maximum de 0,45. Les marqueurs ont été encodés comme l'illustre le tableau 7.

Loci parentaux	Ségrégation	Génotypes possibles	Proportion
Hétérozygote chez <i>M. rotundifolia</i> cv. Regale, 2 allèles co-dominants	<hk x hk>	hh, kk, hk, --	1 : 2 : 1
Hétérozygote chez <i>M. rotundifolia</i> cv. Regale, 2 allèles dominants	<hk x hk> (h- ; kk)	h-, kk, --	3 : 1

**Tableau 7.** Le type de ségrégation retrouvé dans la descendance '42055' est codé comme le préconise le logiciel JoinMap®3.0 dans le cas d'une population F2. Les données manquantes sont indiquées par le symbole « -- ».

#### II.5 Distorsion de ségrégation : test de $\chi^2$

L'adéquation de la ségrégation observée pour chaque marqueur avec les ségrégations attendues (Tableau 7) a été évaluée par un test de  $\chi^2$ . Le test pose comme hypothèse nulle ( $H_0$ ) : les fréquences alléliques observées sont les mêmes que les fréquences théoriquement attendues. Les marqueurs présentant une distorsion de ségrégation ont ainsi été identifiés, pour un risque  $\alpha = 5\%$  (risque de rejeter  $H_0$  alors qu'elle est vraie).

### III. Résultats

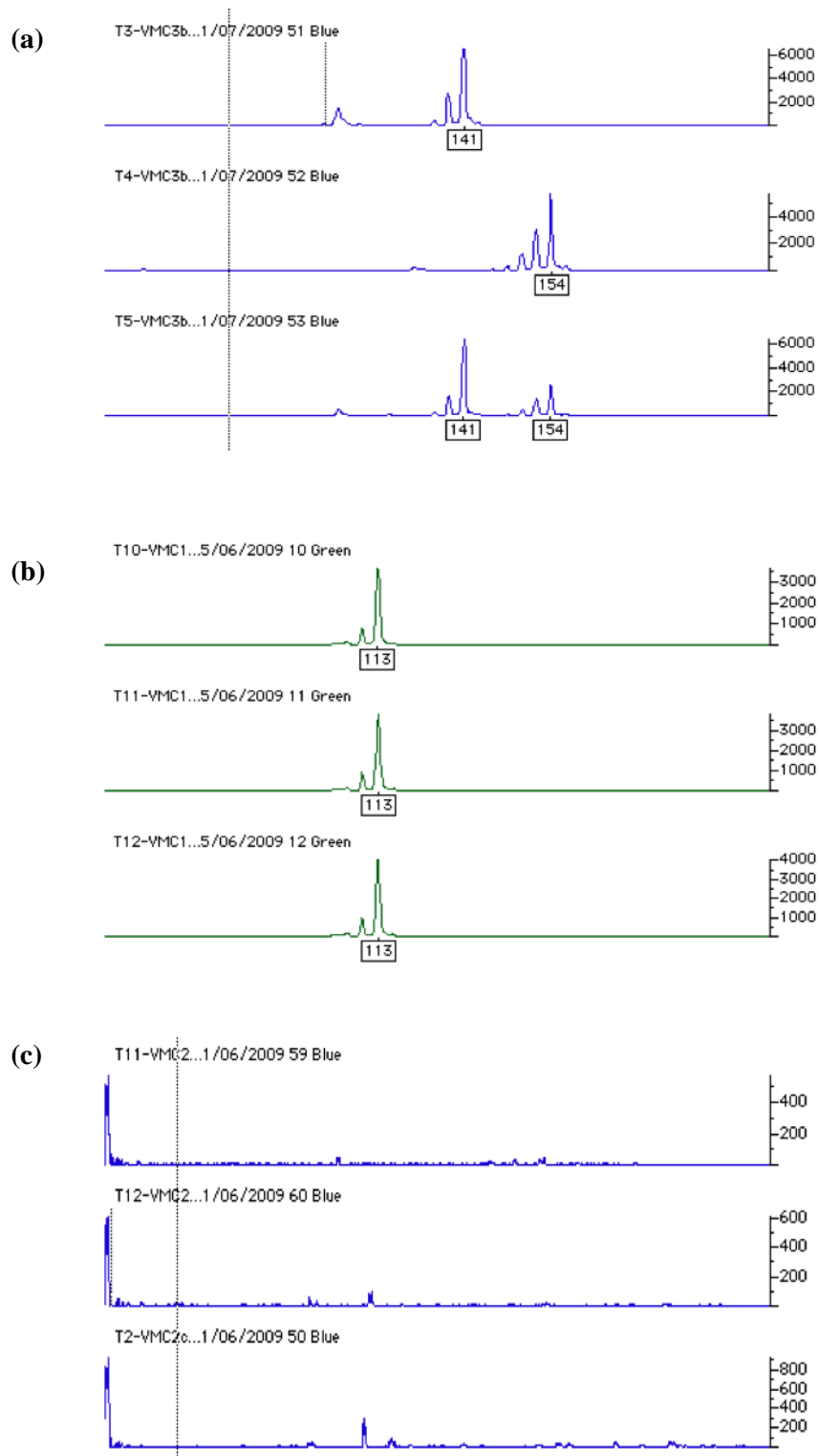
#### III.1 Construction de la carte génétique de *M. rotundifolia*

##### III.1.1 Test du polymorphisme des marqueurs moléculaires

La construction d'une carte génétique nécessite que les marqueurs moléculaires employés soient polymorphes, c'est à dire présentent de la variation allélique. Une première étape a donc consisté à tester le niveau de polymorphisme des loci microsatellites, afin de retenir les marqueurs présents sous deux formes alléliques au sein de la population '42055'.

Au total 480 paires d'amorces flanquant les SSR ont été testées sur un échantillon de 8 ou 12 individus de la population '42055' ainsi que sur le parent 'Regale' de la population. Cent quatre-vingt-six loci (38,8%) se sont révélés hétérozygotes chez le parent, donc ont montré du polymorphisme dans la population, 209 (43,5%) ont été identifiés comme étant homozygotes, et 85 loci (17,7%) n'ont pas amplifié ou ont donné un profil non exploitable (Figure 15).

Pour la plupart des groupes de liaison (GL) identifiés pris indépendamment, on retrouve les proportions de marqueurs hétérozygotes, homozygotes et non amplifiables obtenues pour l'ensemble des 480 marqueurs testés (Tableau 8). Néanmoins des disparités existent au sein des groupes de liaison. Le pourcentage de SSR hétérozygotes par groupe de liaison varie entre 22% (GL10) à 67% (GL5), celui des SSR homozygotes de 20% (GL8) à 70% (GL10), et il varie de 0% (GL5) à 40% (GL8) pour les SSR non amplifiables. On remarque ainsi notamment que sur le GL10, la proportion de SSR homozygotes, donc non cartographiables, s'avère particulièrement forte, inversement la proportion de SSR hétérozygotes est très faible sur ce GL. Au contraire le rendement en SSR hétérozygotes cartographiables est bien meilleur que la moyenne pour le GL5 et le GL6. Sur ces GL, très peu de SSR non interprétables ont été mis en évidence.



**Figure 15.** Exemples d'amplification de loci microsatellites. (a) hétérozygote, deux formes alléliques présentes au locus ; (b) homozygote, une seule forme allélique au locus dans la population ; (c) non amplifié ou ininterprétable.

PARTIE A

Groupe de liaison	SSR Htz	SSR Hmz	SSR NI	Total
<b>1</b>	9 (47%)	7 (37%)	3 (16%)	19
<b>2</b>	8 (42%)	9 (47%)	2 (11%)	19
<b>3</b>	6 (35%)	6 (35%)	5 (29%)	17
<b>4</b>	6 (46%)	6 (46%)	1 (8%)	13
<b>5</b>	10 (67%)	5 (33%)	0 (0%)	15
<b>6</b>	11 (65%)	5 (29%)	1 (6%)	17
<b>7</b>	18 (37%)	23 (47%)	8 (16%)	49
<b>8</b>	6 (40%)	3 (20%)	6 (40%)	15
<b>9</b>	8 (32%)	11 (44%)	6 (24%)	25
<b>10</b>	6 (22%)	19 (70%)	2 (7%)	27
<b>11</b>	9 (35%)	12 (46%)	5 (19%)	26
<b>12</b>	10 (50%)	7 (35%)	3 (15%)	20
<b>13</b>	9 (41%)	9 (41%)	4 (18%)	22
<b>14</b>	19 (41%)	20 (43%)	7 (15%)	46
<b>15</b>	5 (38%)	6 (46%)	2 (15%)	13
<b>16</b>	5 (50%)	3 (30%)	2 (20%)	10
<b>17</b>	6 (43%)	6 (43%)	2 (14%)	14
<b>18</b>	10 (37%)	11 (41%)	6 (22%)	27
<b>19</b>	5 (31%)	7 (44%)	4 (25%)	16
<b>Multiloci</b>	3 (38%)	5 (63%)	0 (0%)	8
<b>NA</b>	17 (27%)	29 (47%)	16 (26%)	62
<b>Total</b>	<b>186 (39%)</b>	<b>209 (44%)</b>	<b>85 (18%)</b>	<b>480</b>

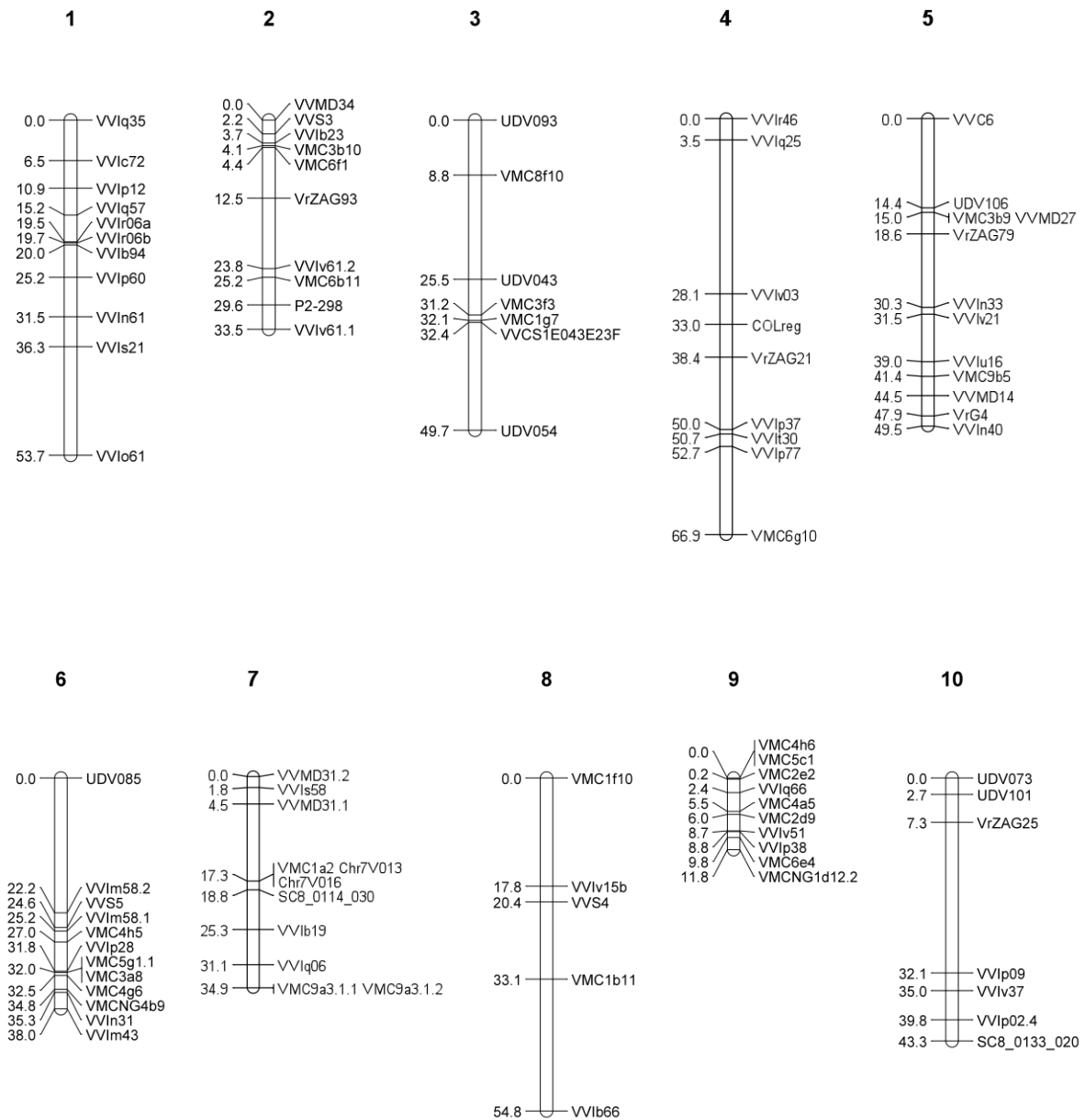
**Tableau 8.** Pourcentage de SSR hétérozygotes (Htz), homozygotes (Hmz) et non interprétables (NI) par groupe de liaison génétique, pour ceux qui ont pu être effectivement attribués à un groupe de liaison de *V. vinifera*. La ligne « Multiloci » indique les SRR qui amplifient sur plusieurs régions génomiques chez *V. vinifera*. Les SSR non affectés (NA) représentent les marqueurs non précédemment cartographiés sur *V. vinifera*.

### III.1.2 Carte génétique de *M. rotundifolia*

Les 186 SSR hétérozygotes chez le parent 'Regale' ont été retenus pour la suite du travail, c'est à dire la construction de la carte génétique en elle-même. Ils ont été amplifiés chez les 191 individus constituant la population '42055' ainsi que chez le parent 'Regale'. 194 loci utiles (certains SSR possédant plusieurs sites d'amplification sur le génome) ont ainsi pu être détectés sur la population, 153 étant codominants (hh,hk,kk) et 41 montrant un profil dominant (h-, kk). Sur les 194 loci polymorphes détectés, 191 ont été cartographiés avec succès. Les marqueurs restant ont été liés à un groupe de liaison mais n'ont pas pu être cartographiés en raison d'une liaison génétique insuffisante avec les autres marqueurs du groupe. Un test de  $\chi^2$  réalisé sur les 194 loci polymorphes indique une distorsion de ségrégation pour 32 marqueurs, soit 16,5% des loci. En particulier, tous les marqueurs des GL6, GL8 et GL19 présentent un biais de ségrégation, formant parfois des clusters comme dans le cas de la partie inférieure du GL6.

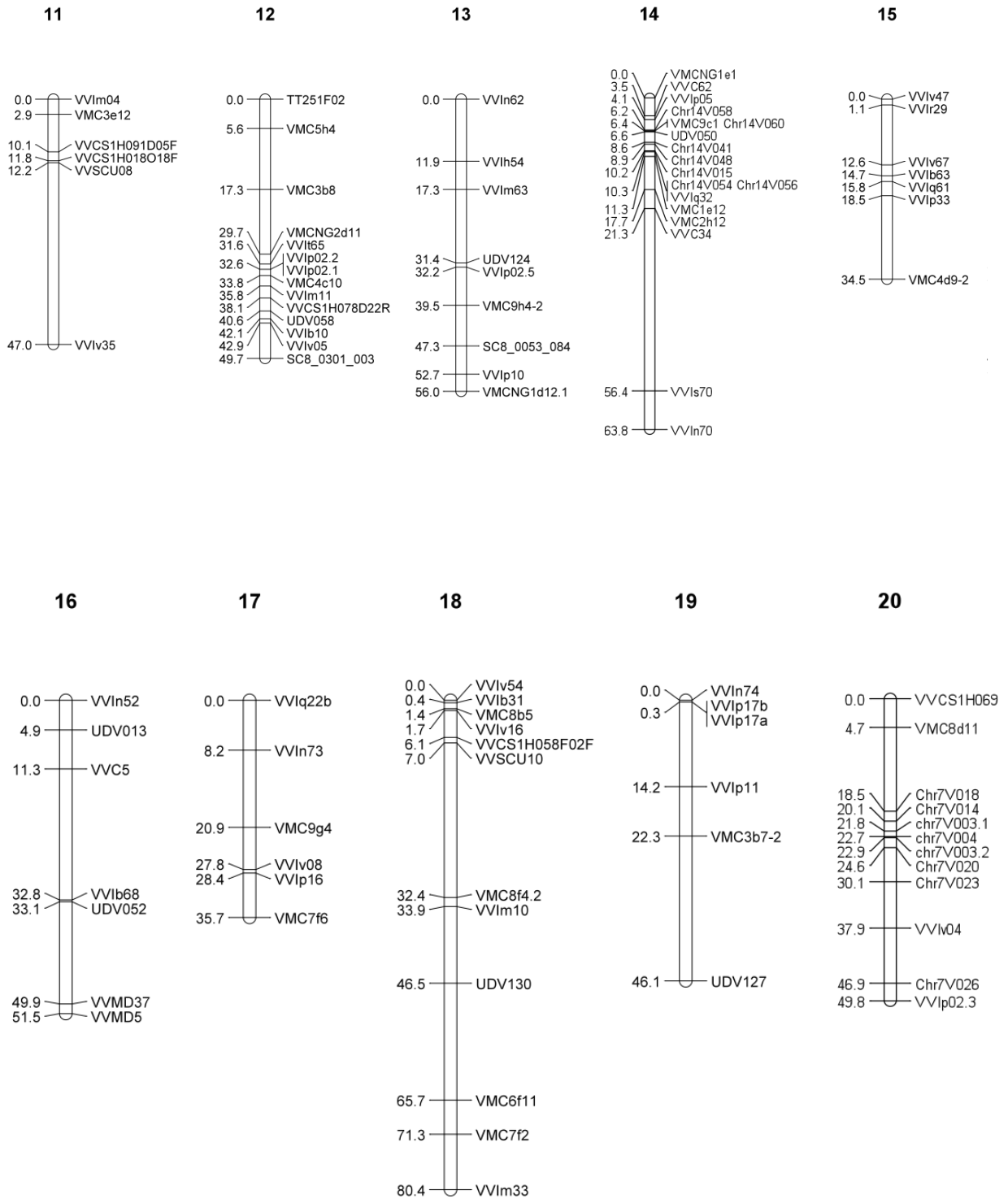
La carte génétique comporte 20 groupes de liaison (Figure 16). Ce chiffre est en cohérence avec le nombre chromosomique attendu pour *M. rotundifolia* (Patel & Olmo 1955; Bouquet 1983). La longueur totale de la carte est de 950,6 cM, avec une distance moyenne entre les marqueurs de 5,0 cM. Le plus grand GL en termes de distance génétique, le GL18, comporte 12 marqueurs cartographiés couvrant 80,4 cM, et le plus petit, le GL9, comporte 10 marqueurs cartographiés couvrant 11,8 cM. En termes de couverture en marqueurs, le plus grand GL est le GL14, qui porte 18 marqueurs, et le plus petit est le GL8, qui en porte 5. De manière globale, seuls 9 intervalles entre 2 marqueurs ont une taille supérieure à 20 cM. Le plus grand intervalle entre deux marqueurs est 35 cM, sur le GL11 entre VVCSU08 et VVIv35, et sur le GL14, entre les marqueurs VVC34 et VVI70. Certains marqueurs montrent un profil multilocus, c'est-à-dire qu'ils ont été localisés soit sur plusieurs GL de la carte, soit sur des GL différents de ceux correspondant à leur localisation présumée (VVIv61, VVIb19, VMCNG1d12, VVIp02 et VVCS1E043E23F1-1). Quinze marqueurs SSR (VVIr06, UDV054, VVIq25, VVIu16, VrG4, VVIIm58, VVIq06, VVIv51, VMC5h4, VVIv47, VVIr29, VVC5, VVIb68, UDV130 et VVIIm33), dont les positions étaient inconnues selon les cartes génétiques précédemment publiées et selon la séquence 12X du génome de la vigne (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>), ont pu être précisément positionnés dans ce travail sur dix GL différents.





**Figure 16.** Carte génétique de la population S1 issue de l'autofécondation de *M. rotundifolia* cv. Regale, comportant 20 groupes de liaison et 191 marqueurs moléculaires de type SSR. Les groupes de liaison sont numérotés 1 à 19 selon Adam-Blondon *et al.* (2004) et Doligez *et al.* (2006), et le GL restant est appelé GL20.

PARTIE A



**Figure 16 (suite).** Carte génétique de la population S1 issue de l'autofécondation de *M. rotundifolia* cv. Regale.

### III.2 Comparaison des cartes génétiques de *V. vinifera* et *M. rotundifolia*

L'ordre des marqueurs sur la carte génétique de *M. rotundifolia* est cohérent aussi bien avec l'ordre déterminé à partir de la séquence du génome de *V. vinifera* [Jaillon *et al.*, 2007 ; <http://www.genoscope.cns.fr/spip/Vitis-vinifera-sequencage.html>) qu'avec les cartes génétiques de référence pour *V. vinifera* (Adam-Blondon *et al.*, 2004; Doligez *et al.*, 2006) (Exemple en Figure 17a ; Annexe 1). La dernière carte de référence publiée pour *V. vinifera* est la carte de Doligez *et al.* (2006), c'est pourquoi c'est la carte qui est communément citée en référence pour *V. vinifera*, et que j'emploie dans ce travail pour établir une comparaison avec *M. rotundifolia* (Figures 17 et 18 ; Tableaux 9 et 10).

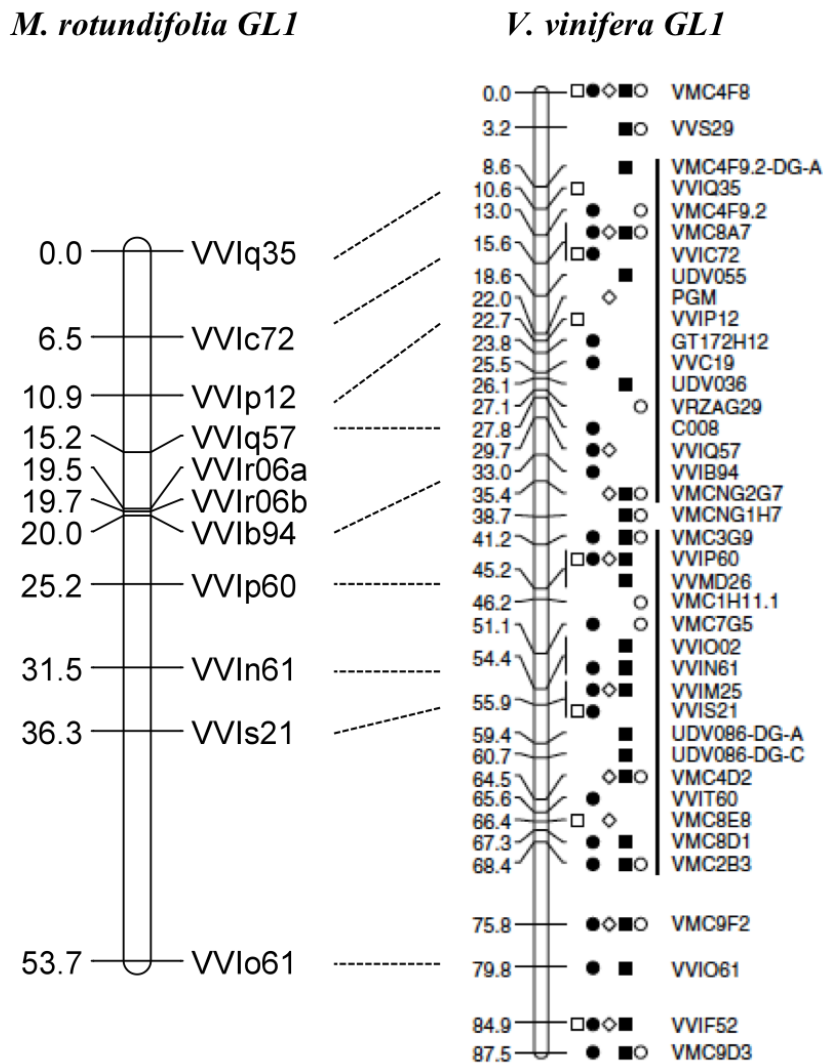
Deux exceptions à la synténie parfaitement conservée entre *M. rotundifolia* et *V. vinifera* sont constatées [(LG6: 'VVIp28 à VVIm43'); (LG12: 'VMC4c10 à VVIv05')] (Figure 17b). Dans ces régions, de petits décalages dans l'ordre des marqueurs sont ponctuellement observés, en particulier en ce qui concerne le positionnement de VMC4g6 sur le GL6 et de VVIm11 sur le GL12.

Sur la base des cartes de référence publiées pour *V. vinifera* (Adam-Blondon *et al.*, 2004; Doligez *et al.*, 2006), le GL7 de *V. vinifera* se retrouve séparé en deux chez la muscadine, donnant les GL7 et GL20 de la carte de *M. rotundifolia*. Le GL20 correspond à la partie inférieure du GL7 de *V. vinifera* (Figure 18).

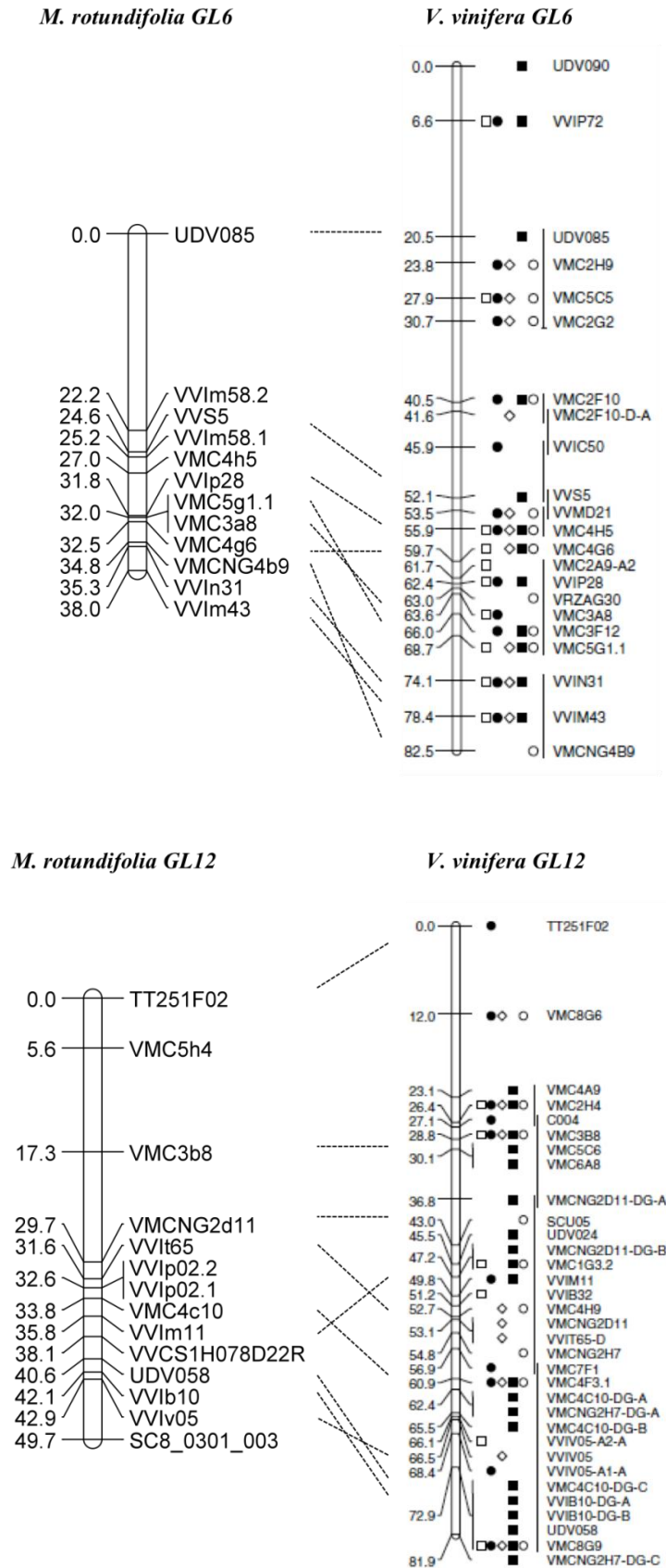
La synténie entre les deux GL7 de *M. rotundifolia* et *V. vinifera* est parfaitement respectée, le marqueur VMC9a3.1 représentant l'extrémité inférieure la plus distale du GL7 de *M. rotundifolia* (Figure 18).

Deux marqueurs SSR, VMC8d11 et VVIv04, cartographiés sur le GL20 de *M. rotundifolia*, sont localisés sur la partie inférieure du GL7 de *V. vinifera*, selon Doligez *et al.* (2006). Le marqueur VVSC1H069 (abréviation pour VVCS1H069K09R1-1), qui constitue l'extrémité supérieure la plus distale du GL20 chez *M. rotundifolia*, a récemment été cartographié par l'URGV (Evry, France) sur le GL7 de *V. vinifera* (<http://urgi.versailles.inra.fr/GnpMap/mapping/id.do?action=MAP&id=105> ; carte « Integrated\_2\_080717 »). Sa position se situe à 3 cM au-dessus de VMC8d11, et à 22 cM au-dessus de VVIv04. La synténie globale est donc également conservée sur le GL20 de *M. rotundifolia*, par comparaison avec la partie inférieure du GL7 de *V. vinifera*. Les amorces permettant d'amplifier les marqueurs de type Chr7 ont été créées à partir de la séquence 12X du génome de la vigne (Jaillon *et al.*, 2007 ;

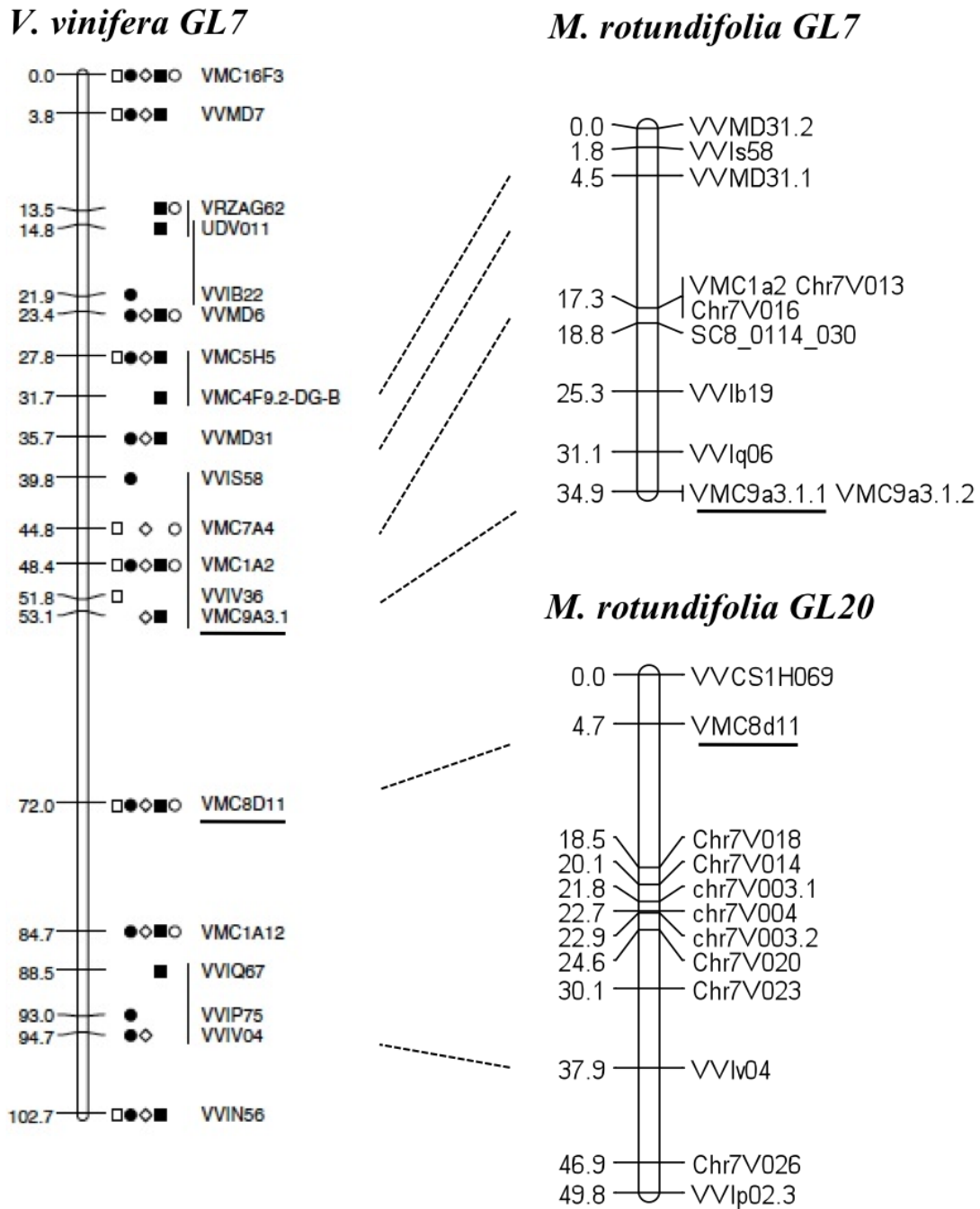
<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>). Ces marqueurs sont situés à différentes positions le long du chromosome 7 de *V. vinifera*. Sur la carte de *M. rotundifolia*, ils sont en grande majorité localisés sur le GL20 (Figure 18). L'ordre de ces marqueurs est synténique en comparaison avec la séquence 12X du génome de la vigne, à l'exception du marqueur Chr7V014. Ce marqueur se situe, sur le génome de *V. vinifera*, entre les marqueurs VMC9a3.1 et VVSC1H069, mais est localisé en-dessous de Chr7V018 sur la carte génétique de *M. rotundifolia*.



**Figure 17a.** Comparaison macrosynténique entre les GL1 de *M. rotundifolia* de *V. vinifera* (Doligez *et al.*, 2006). Les traits en pointillés relient les marqueurs communs entre les deux cartes génétiques. Les lignes verticales pleines sur la carte de *V. vinifera* indiquent des groupes de marqueurs dont l'ordre local n'est pas sûr à LOD 2.0.



**Figure 17b.** Comparaison macrosynténique entre les GL6 et 12 de *M. rotundifolia* de *V. vinifera* (Doligez *et al.*, 2006). Légende détaillée : voir Figure 17a.



**Figure 18.** Comparaison macrosynténique entre le GL7 de *V. vinifera* (Doligez *et al.*, 2006) et les GL7 et 20 de *M. rotundifolia*. VMC9a3.1 et VMC8d11 (soulignés) sont séparés par 18,9 cM sur la carte de référence de *V. vinifera*, mais chez *M. rotundifolia* ils sont situés respectivement à l'extrémité inférieure du GL7 et supérieure du GL20. Les traits en pointillés relient les marqueurs communs entre les deux cartes génétiques.

## PARTIE A

La carte génétique de *M. rotundifolia* couvre en moyenne 58% en distance génétique de la carte de référence de Doligez *et al.* (2006) (Tableau 9). Néanmoins, le rapport de distances génétiques obtenu en utilisant les marqueurs les plus distaux communs entre les deux cartes est de 70%, ce qui suggère que le taux de recombinaison est en moyenne plus faible dans la carte de *M. rotundifolia* que dans la carte de référence de Doligez *et al.* (2006) (Tableau 9). En prenant en compte ce taux de recombinaison plus faible, la couverture globale de la carte de *M. rotundifolia* est estimée à 83% (0,58/0,70). D'autre part, si le taux de recombinaison apparaît 30% inférieur de manière générale chez *M. rotundifolia*, en comparaison avec la carte génétique de Doligez *et al.* (2006), il est 85% inférieur sur le GL9 de *M. rotundifolia*. Par contre, il est 1,46 et 2 fois supérieur sur le GL20 et sur le GL7 de *M. rotundifolia* (Tableau 9).

Groupe de liaison	Marqueurs communs entre les cartes		Distance génétique entre marqueurs communs			Distance génétique maximum		
	Marqueur de début	Marqueur de fin	Carte de référence	Carte de <i>M. rotundifolia</i>	Rapport	Carte de référence	Carte de <i>M. rotundifolia</i>	Rapport
1	VVIq35	VVIo61	69,2	53,7	0,78	87,5	53,7	0,61
2	VVMD34	P2-298	48,2	29,6	0,61	79,7	33,5	0,42
3	UDV093	VMC1g7	45,2	32,1	0,71	70,3	49,7	0,71
4	VVIr46	VMC6g10	87,9	66,9	0,76	90,9	66,9	0,74
5	VVC6	VVIIn40	79	49,5	0,63	83,4	49,5	0,59
6	UDV085	VVIIn43	57,9	38,0	0,66	82,5	38,0	0,46
7Mr/7sup.Vv	VVMD31	VMC9a3.1	17,4	34,9	2,00	102,7	34,9	0,34
8	VMC1f10	VVIb66	87	54,8	0,63	112,7	54,8	0,49
9	VMC5e1	VMC6e4	60,6	9,8	0,16	104,1	11,8	0,11
10	UDV073	VVIv37	56,7	35,0	0,62	83,7	43,3	0,52
11	VVIIn04	VVIv35	64,5	47,0	0,73	75,1	47,0	0,63
12	TT251F02	VVIb10	72,9	42,1	0,58	81,9	49,7	0,61
13	VVIIn62	VMCNG1d12.1	92,4	56	0,61	101,1	56,0	0,55
14	VMCNG1e1	VVIIn70	94,8	63,8	0,67	94,8	63,8	0,67
15	VVIv67	VMC4d9.2	32,4	21,9	0,68	37,9	34,5	0,91
16	VVIIn52	VVMD5	61,8	51,5	0,83	92,4	51,5	0,56
17	VVIq22b	VMC7f6	35,6	35,7	1,00	58	35,7	0,62
18	VVIb31	VMC7f2	94	70,9	0,75	131,5	80,4	0,61
19	VVIIn74	UDV127	63,9	46,1	0,65	76,6	46,1	0,60
20Mr/7inf.Vv	VMC8d11	VVIv04	22,7	33,2	1,46	-	49,8	-
Total			1244,1	871,6	0,70	1646,8	950,6	0,58

**Tableau 9.** Comparaison de la couverture génomique et des distances génétiques entre la carte génétique de référence pour *V. vinifera* de Doligez *et al.* (2006) et la carte génétique de *M. rotundifolia*. Mr = *M. rotundifolia* ; Vv = *Vitis vinifera*.

Afin de mettre en relation ces distances génétiques avec les distances physiques existant entre marqueurs, une analyse a ensuite été réalisée au regard des distances physiques fournies par la séquence 12X du génome de la vigne (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>) (Tableau 10). Les marqueurs du tableau 10 ne sont pas toujours identiques à ceux du tableau 9, car tous ne sont pas référencés sur le site de la séquence du génome de la vigne (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>).

En moyenne sur l'ensemble des GL, 1cM de la carte de Doligez *et al.* (2006) représentent 225 kb. Chez *M. rotundifolia*, ce chiffre s'élève à 357 kb. De manière générale les résultats de cette analyse confirment ceux présentés dans le Tableau 9. Le taux de recombinaison existant sur un chromosome est inversement proportionnel à la distance physique montrée dans le Tableau 10 : plus la distance physique couverte par cM est élevée, plus le taux de recombinaison sera faible sur cette partie de chromosome. Il est particulièrement faible sur le GL9 chez *M. rotundifolia*, en comparaison avec le GL9 de *V. vinifera* : la distance physique sur la carte de référence est conforme à la moyenne globale, alors que sur la carte de *M. rotundifolia*, 1cM représente plus de 1,3Mpb.

Sur la partie supérieure du GL7 en revanche, la distance physique couverte par cM sur la carte de *V. vinifera* est nettement supérieure à la moyenne (521 kb) (Tableau 10). Le taux de recombinaison sur le GL7 de *M. rotundifolia* semble certes supérieur à la moyenne, mais il est surtout particulièrement faible chez *V. vinifera*. Cela explique en majeure partie le taux de recombinaison deux fois supérieur que l'on trouve pour le GL7 de *M. rotundifolia*.

Enfin, le taux de recombinaison est supérieur à la moyenne sur la partie inférieure du GL7 de *V. vinifera*, et il augmente drastiquement sur le GL20 *M. rotundifolia*, puisque 1cM ne représentent que 81 kpb sur ce GL. Sur ces deux régions génomiques homologues, le taux de recombinaison est donc supérieur à la moyenne chez les deux espèces, bien que particulièrement élevé chez *M. rotundifolia*.



## PARTIE A

Groupe de liaison	Marqueurs communs			Distance physique couverte par 1cM (kb)		
	Marqueur de début	Marqueur de fin	Distance physique entre les marqueurs (Mb)	Carte de référence	Carte de <i>M. rotundifolia</i>	Rapport
1	VVIq35	VVIo61	14,95	216	278	0,78
2	VVIb23	VMC6b11	3,26	103	152	0,68
3	VMC8f10	VMC1g7	5,22	150	224	0,67
4	VVIr46	VMC6g10	22,03	251	329	0,76
5	VVC6	VVIN40	23,36	296	472	0,63
6	VMC4h5	VVIa43	5,39	240	490	0,49
7Mr/7sup.Vv	VVMD31	VMC9a3.1	9,08	521	260	2
8	VMC1f10	VVIb66	17,98	207	328	0,63
9	VMC5c1	VMC6e4	13,28	219	1351	0,16
10	VrZAG25	VVIv37	8,69	199	313	0,64
11	VVIa04	VVIv35	15,10	234	321	0,73
12	TT251F02	VVIa11	8,06	162	225	0,72
13	VVIN62	VVIp10	20,91	265	397	0,67
14	VMCNG1e1	VVIN70	28,44	300	446	0,67
15	VVIv67	VMC4d9.2	5,68	175	259	0,68
16	-	-	-	-	-	-
17	VVIq22b	VVIp16	6,52	183	229	0,80
18	VMC8b5	VMC7f2	23,53	251	337	0,74
19	VVIN74	VMC3b7-2	6,46	192	290	0,66
20Mr/7inf.Vv	VVCS1H069	VVIv04	3,08	107	81	1,32
Moyenne				225	357	0,63

**Tableau 10.** Distance physique entre les marqueurs les plus distaux communs aux deux cartes génétiques et référencés sur la séquence 12X du génome de la vigne (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>), et comparaison des distances physiques que couvrent 1cM de la carte de référence de *V. vinifera* et 1cM de la carte de *M. rotundifolia*, sur la base de la séquence 12X du génome de la vigne.

	Carte génétique 'Regale'	Carte génétique 'Fry' x 'Trayshed'		
		Carte 'Fry'	Carte 'Trayshed'	Carte consensus
Nombre GL	20	18	19	19
Nombre marqueurs	191	212	191	314
Couverture (cM)	950,6	879,0	841,8	1088,0
Distance moyenne. entre marqueurs (cM)	5,0	4,1	4,3	3,5
Marqueurs polymorphes (%)	39	34	30	45
Marqueurs distordus (%)	16,5	11	13,4	14,9
Nombre espaces >20cM	9	3	2	0

**Tableau 11.** Comparaison des cartes génétiques de *M. rotundifolia* publiées à ce jour, utilisant les cultivars 'Regale' (Blanc *et al.*, 2012) et 'Fry' x 'Trayshed' (Riaz *et al.*, 2012).

## IV. Discussion

Lors de ce travail, une carte génétique a été construite pour l'espèce *M. rotundifolia*. Créée à l'aide d'une descendance issue de l'autofécondation de *M. rotundifolia* cv. Regale, cette carte constitue une carte de référence pour l'espèce et a fait l'objet d'une publication dans la revue internationale *Theoretical and Applied Genetics*, (Blanc *et al.*, 2012, annexe 2).

Une seconde carte génétique, réalisée à partir d'une population F1 de 206 individus issue du croisement *M. rotundifolia* cv. Fry x *M. rotundifolia* cv. Trayshed, a été publiée à peu près à la même période pour la muscadine par Riaz *et al.* (2012). La première partie de cette discussion s'attachera donc à comparer ces deux cartes génétiques de référence pour l'espèce.

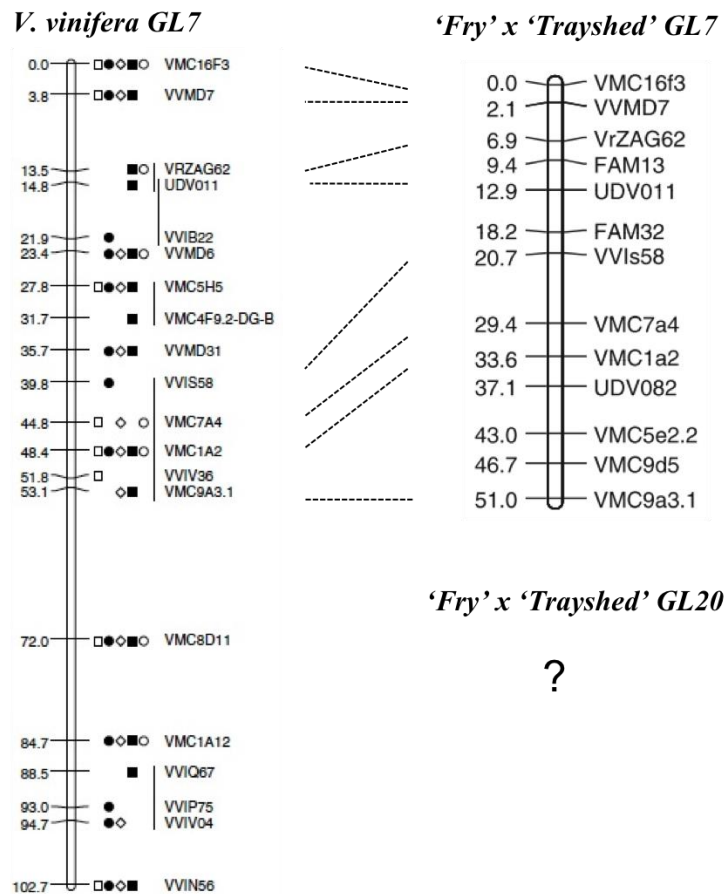
### IV.1 Comparaison générale des cartes génétiques établies pour 'Regale' et pour 'Fry' x 'Trayshed'

La carte établie pour 'Regale' dans ce travail comporte 191 marqueurs SSR couvrant 950 cM environ sur les 20 GL de *M. rotundifolia*. Dans les travaux de Riaz *et al.* (2012), les cartes génétiques proposées ont été établies grâce à des marqueurs SSR et AFLP. La carte du parent 'Fry' comprend 212 marqueurs couvrant 879cM sur 18 GL, celle du parent 'Trayshed' comprend 191 marqueurs couvrant 841cM sur 19 GL : la carte consensus qui en résulte comprend 314 marqueurs couvrant 1088 cM sur 19 GL (Tableau 11). En termes de nombre de marqueurs cartographiés et de couverture globale, chaque carte prise séparément n'apporte pas plus d'information que la carte de 'Regale', mais l'intégration des deux cartes 'Fry' et 'Trayshed' permet d'améliorer la couverture en marqueurs de la carte génétique consensus. En effet, le polymorphisme qui n'est pas couvert sur une carte peut l'être sur l'autre carte, ce qui augmente le nombre global de marqueurs cartographiés. D'une manière générale, la carte consensus 'Fry' x 'Trayshed' comporte plus de marqueurs et moins d'espaces vides notables que la carte de 'Regale' (Tableau 11), mais tous les GL ne sont pas couverts et on constate une hétérogénéité très importante dans la répartition des marqueurs.

Bien que certains marqueurs soient communs entre les cartes de 'Regale' et de 'Fry' x 'Trayshed', la majorité des marqueurs est différente, ce qui est probablement dû à un polymorphisme variable des marqueurs dans les cultivars 'Regale', 'Fry' et 'Trayshed'. La synténie entre les marqueurs des cartes établies pour *M. rotundifolia* (Riaz *et al.*,

2012; Blanc *et al.*, 2012) et *V. vinifera* (Doligez *et al.*, 2006) est parfaitement conservée, à l'exception du GL12, pour lequel les résultats de Riaz *et al.* (2012) sont cohérents avec ceux de Doligez *et al.* (2006) concernant la position du marqueur VVIm11 (voir Figure 17b). Les raisons de cette divergence restent à explorer.

Dans la carte 'Fry' x 'Trayshed', seuls 19 GL sont couverts. Le GL7 correspond, comme chez 'Regale', à la partie supérieure du GL7 de *V. vinifera*. L'ordre des marqueurs moléculaires dans cette zone est parfaitement synténique avec les cartes de 'Regale' et de *V. vinifera* (Figure 19). Néanmoins aucun marqueur ne couvre la partie inférieure du GL7 de *V. vinifera* (Figure 19). C'est vraisemblablement la raison pour laquelle Riaz *et al.* (2012) n'ont pas pu mettre en évidence de 20<sup>ème</sup> chromosome chez 'Fry' ni 'Trayshed'. L'hypothèse peut être émise qu'aucun marqueur polymorphe n'a été détecté dans cette région génomique, conduisant à l'obtention d'une « zone noire » dans leur carte génétique.



**Figure 19.** Comparaison macrosynténique entre le GL7 de *V. vinifera* (Doligez *et al.*, 2006) et le GL7 de *M. rotundifolia* 'Fry' x 'Trayshed' (Riaz *et al.*, 2012). Les traits en pointillés relient les marqueurs communs entre les deux cartes génétiques. Le signe « ? » signifie qu'aucun GL20 n'a été mis en évidence chez 'Fry' x 'Trayshed'.

#### IV.2 Recombinaison et distorsion de ségrégation chez la muscadine

Le taux de recombinaison est en moyenne plus faible dans la carte de ‘Regale’ que dans la carte de référence *V. vinifera* de Doligez *et al.* (2006) (Tableau 9). Les travaux de cartographie publiés par Riaz *et al.* (2012) sur ‘Fry’ et ‘Trayshed’ confirment ce résultat, avec un rapport de distances génétiques entre marqueurs communs aux cartes ‘Fry’ x ‘Trayshed’ et *V. vinifera* (Doligez *et al.*, 2006) à peu près égal à celui obtenu dans notre travail (0,73). Blasi *et al.* (2011) ont abouti à la même conclusion avec la carte génétique de *V. amurensis* (rapport de 0,72).

Dans ce cas deux hypothèses peuvent être posées : (i) soit le taux de recombinaison chez les deux espèces *M. rotundifolia* et *V. amurensis* est globalement plus faible que chez *V. vinifera* ; (ii) soit la carte établie par Doligez *et al.* (2006) a tendance à surestimer les distances génétiques. En se basant sur les dernières données de cartographie génétique disponibles en ligne pour *V. vinifera* (<http://urgi.versailles.inra.fr/GnpMap/mapping/id.do?action=MAP&id=105>), et bien que ces données soient parcellaires, il semble que la deuxième hypothèse soit la plus vraisemblable. En effet les distances génétiques entre les marqueurs communs semblent à peu près identiques. En considérant cette hypothèse comme vraie, le GL9 de *M. rotundifolia* demeure un chromosome sur lequel la recombinaison est très faible, et les résultats obtenus sur les taux de recombinaison des GL7 et 20 n’en sont que d’autant plus marqués.

Néanmoins, la mise à disposition d’une carte consensus plus récente pour *V. vinifera*, plus dense et plus riche en marqueurs communs avec la carte de *M. rotundifolia* nous permettrait de trancher entre les deux hypothèses.

Entre les deux cartes établies pour la muscadine, ‘Regale’ et ‘Fry’ x ‘Trayshed’, les rapports de distances génétiques entre les marqueurs communs sont en moyenne très proches (0,91), avec un taux de recombinaison légèrement supérieur dans la carte ‘Fry’ x ‘Trayshed’ (Tableau 12).

Le manque de marqueurs communs entre les deux cartes sur certains GL rend la comparaison délicate. C’est le cas du GL2, sur lequel la distance commune entre marqueurs sur les deux cartes est trop faible pour être significative (Tableau 12).

Néanmoins, il est intéressant de noter que le rapport de distances génétiques entre marqueurs communs sur le GL7 est identique entre les cartes génétiques de ‘Regale’ et

## PARTIE A

de 'Fry' x 'Trayshed' (1,06). Les résultats obtenus par Riaz *et al.* (2012) sur ce GL confirment donc les nôtres.

Par ailleurs, le fait de ne pas disposer à l'heure actuelle d'une carte physique pour *M. rotundifolia* constitue une limite aux résultats présentés dans le tableau 10. Les calculs de distance physique ont été effectués pour *M. rotundifolia* et *V. vinifera* par rapport aux informations disponibles sur la séquence du génome de *V. vinifera*, ce qui peut générer un biais.

Groupe de liaison de 'Regale'	Marqueurs communs entre les cartes		Distance génétique entre marqueurs communs		
	Marqueur de début	Marqueur de fin	Carte de 'Fry'x'Trayshed'	Carte de 'Regale'	Rapport
1	VVIc72	VVIo61	50,8	47,2	0,93
2	VVIb23	VMC6f1	2,1	0,7	0,33
3	VMC8f10	UDV043	16,7	16,7	1,00
4	VVIq25	VVIp37	53,3	46,6	0,87
5	VMC3b9	VVIIn40	43,2	34,7	0,80
6	UDV085	VMCNG4b9	28,5	34,8	1,22
7	VVIIs58	VMC9a3.1	30,3	32,0	1,06
8	VVIv15b	VVIb66	42,4	37	0,87
9	VVIq66	VMC6e4	9,8	7,4	0,76
10	VVIv37	VVIv37	-	-	-
11	VMC3e12	VVSCU08	9,0	9,3	1,03
12	VMC5h4	VVIv05	44,7	37,3	0,83
13	UDV124	VVIp10	21,8	21,3	0,98
14	VMCNG1e1	VVIIn70	86,8	64,0	0,74
15	VVIv67	VMC4d9.2	34,8	34,5	0,99
16	UDV013	UDV052	34,0	28,2	0,83
17	VVIIn73	VVIp16	23,1	20,2	0,87
18	VVIv16	UDV130	49,7	44,8	0,90
19	VVIIn74	UDV127	37,2	46,1	1,24
20	VMC8d11	VVIv04	-	-	-
Total			618,2	562,8	0,91

**Tableau 12.** Comparaison de la couverture génomique et des distances génétiques entre les cartes génétique de *M. rotundifolia* 'Regale' (Blanc *et al.*, 2012) et de *M. rotundifolia* 'Fry' x 'Trayshed' (Riaz *et al.*, 2012).

En ce qui concerne la distorsion de ségrégation, 16,5% des loci SSR hétérozygotes chez 'Regale' ont montré une distorsion par rapport aux ségrégations théoriques attendues. Cette proportion de loci montrant une ségrégation biaisée est équivalente à celle reportée par Lowe & Walker (2006) (16%), inférieure à celles établies par Grando *et al.* (2003) (22.4%) et Troggio *et al.* (2007) (20.3%), et supérieure à celles de Doligez *et al.* (2006) (9.2%) et Blasi *et al.* (2011) (11.3%). Elle est également légèrement supérieure à celle reportée par Riaz *et al.* (2012) (14,9% ; Tableau 9).

Trois régions majeures contenant des marqueurs montrant une distorsion de ségrégation ont été trouvées sur les GL6, 8 et 19 de la carte de 'Regale'. Parmi ces 3 zones, seul un cluster de marqueurs situé sur le GL8 est également retrouvé en distorsion de ségrégation sur la carte issue du croisement 'Fry' x 'Trayshed' (Riaz *et al.*, 2012). Dans cette dernière, 3 clusters majeurs de marqueurs en ségrégation biaisée (montrant plus de 5 marqueurs consécutifs dans cette situation) ont été reportés sur les GL4, 8 et 14. Chez *V. vinifera*, Lowe & Walker (2006) rapportent un cluster sur le GL3, Troggio *et al.* (2007) deux sur les GL9 et 18, alors que Blasi *et al.* (2011) rapportent un seul cluster situé sur le GL7. Il ne semble donc pas y avoir de règle générale concernant les zones en distorsion de ségrégation sur les cartes génétiques chez les *Vitis* et *Muscadinia*, puisqu'elles varient selon l'espèce et les croisements considérés.

#### **IV.3 Hétérogénéité de densité en marqueurs moléculaires**

Chacun des 20 GL de la carte de 'Regale' porte en moyenne 9,5 marqueurs, séparés en moyenne par un intervalle de 5 cM. Malgré nos efforts pour couvrir de façon homogène les différents groupes de liaison, la densité en marqueurs présente des hétérogénéités en fonction des régions génomiques. Certaines régions sont moins denses en marqueurs, comme par exemple la partie inférieure du GL11 (deux marqueurs sur 35cM) et du GL14 (trois marqueurs sur 43cM). Il s'agit soit de zones dans lesquelles moins de marqueurs étaient disponibles pour construire la carte, soit, ce qui est plus généralement le cas, de zones riches en marqueurs homozygotes non cartographiables. A l'inverse d'autres régions sont plus concentrées en marqueurs, comme la partie inférieure des GL6 et 12, le GL9 ou la partie supérieure du GL14. Dans le cas du GL14, cette région a démontré un intérêt dans la suite de mes travaux (voir Partie B), donc de nouveaux marqueurs ont été spécifiquement recherchés dans cette zone. Les parties inférieures des GL6 et 12 correspondent quant à elles à des régions riches en marqueurs hétérozygotes. Enfin, toute la partie supérieure du GL9 (au-dessus de VMC5c1) n'a pas pu être

cartographiée en raison de la présence d'une grande zone d'homozygotie, également observée chez l'espèce asiatique *V. amurensis* (Blasi *et al.*, 2011). Quant à la partie cartographiée sur notre carte de *M. rotundifolia*, elle apparaît riche en marqueurs simplement en raison de distances génétiques qui sont particulièrement faibles en comparaison avec *V. vinifera* : 10 cM relie VMC5c1 et VMC6e4 sur la carte génétique de 'Regale', alors que ces marqueurs sont séparés de 60 cM sur la carte de Doligez *et al.* (2006). Malgré un taux de recombinaison en moyenne plus faible sur la carte de 'Regale' que sur la carte de Doligez *et al.* (2006) (Tableau 9), les distances génétiques sont remarquablement faibles sur le GL9 de la muscadine. Ce résultat indique un taux de recombinaison très inférieur à celui de *V. vinifera* sur ce GL, et donne au GL9 un aspect très condensé sur la carte génétique de *M. rotundifolia*. Ce résultat est confirmé par la carte génétique de Riaz *et al.* (2012) : 9,8 cM séparent les marqueurs VVIq66 et VMC6e4 (marqueurs communs à toutes les cartes) sur la carte 'Fry' x 'Trayshed' et 7,4 cM sur la carte de 'Regale' (Tableau 10), alors que ces marqueurs sont distants de 38,7 cM sur la carte de *V. vinifera* (Doligez *et al.*, 2006).

#### **IV.4 Niveau de synténie entre *M. rotundifolia* et *V. vinifera***

La comparaison de l'ordre des marqueurs sur les cartes génétiques de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* montre un très haut niveau de synténie entre ces deux espèces. La cartographie génétique comparative est un outil efficace permettant de comparer la colinéarité chromosomique entre différentes espèces et genres. Elle peut également permettre de reconstruire les événements qui ont entraîné la formation des caryotypes actuels.

Une synténie conservée est définie comme la colocalisation préservée de loci génétiques et/ou de gènes sur les chromosomes et/ou les groupes de liaison d'espèces différentes. Il convient de distinguer la macrosynténie, qui se base sur de larges portions de chromosomes, et la microsynténie, basée uniquement sur quelques gènes à la fois (Abrouk *et al.*, 2010). La colinéarité est une forme plus spécifique de synténie conservée, qui requiert la colocalisation de gènes avec un ordre génique commun, sur un même chromosome, chez un individu ou au sein d'une espèce (Abrouk *et al.*, 2010). De nombreux réarrangements peuvent être détectés chez les espèces pour lesquelles on dispose de cartes génétiques suffisamment denses en marqueurs. Les cartes génétiques de différentes espèces peuvent être aisément comparées si des marqueurs génétiques communs sont cartographiés. Cet outil a été utilisé avec succès pour différentes espèces.

Un haut niveau de colinéarité a été mis en évidence chez les *Poaceae* (Devos, 2005) et chez les *Fabaceae* (Mudge *et al.*, 2005; Phan *et al.*, 2007; Ellwood *et al.*, 2008; Tsubokura *et al.*, 2008). De même, Gong *et al.* (2008) ont mis en évidence un très haut niveau de macrosynténie entre *Cucurbita moschata* et *Cucurbita pepo*, espèces classées au sein du même genre mais dont le taux de succès extrêmement faible dans l'obtention d'hybrides n'est pas sans rappeler le cas de *V. vinifera* et *M. rotundifolia*.

Entre *Arabidopsis* et *Brassica napus*, deux genres de *Brassicaceae*, il a été montré par cartographie comparative qu'il y avait une forte conservation du contenu en gènes et de l'ordre des gènes entre les deux espèces, avec le maintien de larges plages de similarités équivalentes dans certains cas à 9Mb de séquence génomique d'*Arabidopsis* en continu (Parkin *et al.*, 2005). Cependant, au fur et à mesure que les données de comparaison de séquences se sont accumulées, des recherches ont montré que le contenu en gènes était supérieur chez *A. thaliana*, donnant lieu à nombre de réarrangements géniques induisant des ruptures de synténie sur certaines portions chromosomiques (Qiu *et al.*, 2009).

De la même manière, la comparaison des cartes génétiques de *Prunus* et *Fragaria*, deux genres de *Rosaceae*, a montré, malgré un bon niveau de synténie générale, une colinéarité partielle avec de nombreux réarrangements produits par des inversions, des translocations ou des événements de fusion/fission (Vilanova *et al.*, 2008).

Chez les *Solanaceae*, la cartographie comparative a révélé un haut niveau de colinéarité entre espèces, avec un ordre génique globalement conservé mais montrant une organisation en blocs d'ADN remaniés. De nombreux réarrangements sont visibles au niveau famille et genre, mais l'ordre des gènes au sein de l'espèce *Solanum lycopersicum* (la tomate) est par exemple hautement conservé (Albrecht & Chetelat, 2009). Une étude récente a montré que les génomes du tabac et de la tomate différaient de 3 à 10 inversions et 11 translocations réciproques (Wu *et al.*, 2010). Entre la tomate et la pomme de terre, la microsyténie est bien conservée, néanmoins Zhu *et al.* (2008) ont avancé que leurs génomes différaient dans leur contenu et leur composition en séquences répétées, suggérant que les séquences répétées ont un rôle plus significatif dans la spéciation qu'il n'avait été reporté précédemment.

Des ordres géniques hautement conservés à l'intérieur de blocs réarrangés constituent un phénomène commun chez les plantes, même sur de larges distance phylogénétiques, comme pour la tomate, la pomme de terre, l'aubergine et le poivron (Bonierbale *et al.*, 1988; Tanksley *et al.*, 1992; Livingstone *et al.*, 1999; Doganlar *et al.*, 2002). Des



analyses comparatives identifient même de larges segments génomiques conservés au-delà du niveau de la famille, par exemple entre la tomate/pomme de terre (*Solanaceae*) et *Arabidopsis* (*Brassicaceae*) (Gebhardt *et al.*, 2003; Ku *et al.*, 2000), entre la tomate et le café (*Rubiaceae*) (Lin *et al.*, 2005) ou encore entre le peuplier (*Salicaceae*) et les genres *Prunus* et *Fragaria* (*Rosaceae*) (Jung *et al.*, 2009, 2010). Jung *et al.* (2010) ont aussi mis en évidence un niveau de synténie étonnamment haut entre *Fragaria* et *Vitis*. Ils ont identifié des clusters de gènes R de type NBS-LRR conservés entre les génomes de *Medicago*, *Populus*, *Arabidopsis*, *Fragaria* et *Vitis*.

La macrosynténie conservée entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia* permettra donc de faciliter la recherche de gènes d'intérêt (de résistance aux maladies de type NBS-LRR notamment) provenant de la muscadine, par analogie avec le génome séquencé de *V. vinifera*. Cependant la carte génétique réalisée dans ce travail a été construite à l'aide de marqueurs microsatellites uniquement. Elle permet d'avoir une bonne idée du niveau de macrosynténie existant entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia*, mais elle ne permet pas encore d'émettre des hypothèses sur la microsyténie existant entre les deux espèces. Or, chez les plantes, il peut arriver que malgré une excellente macrosynténie entre les espèces, des ruptures dans la microsyténie puissent empêcher l'identification directe d'un gène candidat pour un caractère donné (Delseny, 2004). Ce fut le cas, par exemple, quand on a cherché à isoler le gène de résistance à la rouille *Rph7* chez l'orge à partir du riz (Brunner *et al.*, 2003). De même, les marqueurs flanquant les gènes *Rfo* restorer chez le radis (genre *Raphanus*) sont colinéaires avec la séquence d'*Arabidopsis*, mais le gène en lui-même est absent chez l'arabette malgré la présence de nombreux homologues ailleurs dans le génome la plante modèle (Brown *et al.*, 2003; Desloire *et al.*, 2003).

Afin de connaître de façon plus précise l'organisation du génome de la muscadine, il est nécessaire de compléter notre carte génétique de sorte à ce qu'elle soit plus dense, à l'aide de marqueurs de type SNP par exemple. En parallèle, une carte physique pour *M. rotundifolia* est en cours de réalisation à l'URGV (Evry, France). La synergie entre les travaux de cartographie génique et de cartographie physique permettra d'augmenter considérablement la connaissance du génome de *M. rotundifolia*, et d'étudier la microsyténie entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia*, notamment dans les régions riches en clusters de gènes de type NBS-LRR, qui sont souvent impliquées dans les phénomènes de résistance aux maladies.

#### IV.5 Cas du groupe de liaison 20 de *M. rotundifolia*

Un des résultats les plus intéressants du travail de cartographie réalisé chez *M. rotundifolia* cv. Regale est la mise en évidence du GL20 de l'espèce. Il est connu que le génome de *M. rotundifolia* contient 20 paires de chromosomes (Patel & Olmo, 1955; Mullins *et al.*, 1992), celui de *V. vinifera* n'en comptant que 19. La cartographie génétique du GL20 de la muscadine permet d'émettre des hypothèses sur son origine.

Le GL7 de *V. vinifera* correspond à deux GL séparés sur la carte de *M. rotundifolia*, le GL7 et le GL20. Le GL20 de *M. rotundifolia* est homologue à la partie inférieure du GL7 de *V. vinifera*. Les marqueurs VMC9a3.1 et VMC8d11, marqueurs communs à toutes les cartes et situés sur deux chromosomes différents chez *M. rotundifolia*, sont séparés de 18,9 cM sur le GL7 de la carte de référence de *V. vinifera* de Doligez *et al.* (2006), et de 12,5 cM sur la carte « Integrated\_2\_080717 » (<http://urgi.versailles.inra.fr/GnpMap/mapping/id.do?action=MAP&id=105>). Sur cette dernière, les marqueurs VMC9a3.1 et VVCS1H69, qui représentent respectivement l'extrémité inférieure du GL7 de *M. rotundifolia* et l'extrémité supérieure du GL20 de *M. rotundifolia*, sont séparés par seulement 9,4 cM.

Deux scénarios sont donc possibles : (i) les GL7 et 20 de *M. rotundifolia* appartiennent à un seul et même chromosome mais ils n'ont pas pu être reliés génétiquement par le logiciel de cartographie ; (ii) les GL7 et 20 de *M. rotundifolia* constituent réellement deux chromosomes séparés.

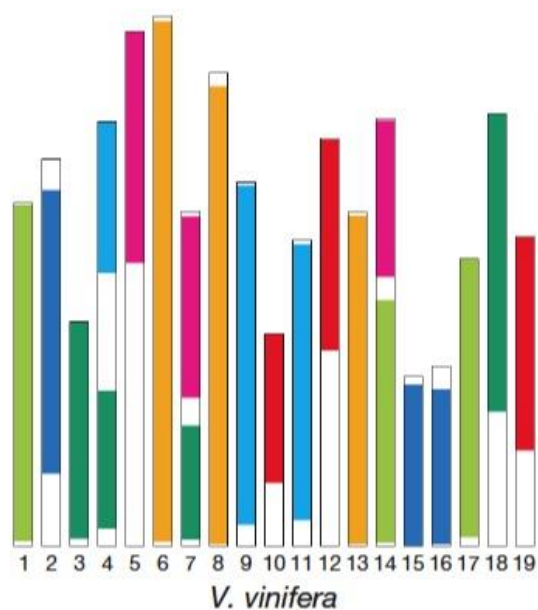
La première hypothèse pourrait être retenue si le taux de recombinaison entre les marqueurs VMC9a3.1 et VVCS1H69 chez la muscadine était trop élevé et que le logiciel de cartographie ne parvenait à les relier génétiquement. Mais cela paraît difficilement plausible, même en considérant un taux de recombinaison deux fois supérieur à celui de *V. vinifera* sur le GL 20 de *Muscadinia*. On peut présumer que, même séparés de 20 ou 30 cM, les marqueurs VMC9a3.1 et VVCS1H69 seraient correctement assemblés sur la carte génétique de *M. rotundifolia* par le logiciel, dans l'hypothèse où le GL7 et le GL20 de la muscadine feraient partie du même chromosome. De plus, la seconde hypothèse est en parfaite cohérence avec l'existence caryotypique de 20 chromosomes chez la muscadine. Nos résultats suggèrent donc fortement que le GL7 de *V. vinifera* est scindé en deux chromosomes distincts chez *M. rotundifolia*, sans remaniement chromosomique majeur si l'on se fie à la macrosyténie globale des marqueurs génétiques sur les chromosomes.

*M. rotundifolia* et *V. vinifera* possèdent un ancêtre commun. Cependant, les taxonomistes sont encore à ce jour divisés sur le statut de genre ou de sous-genre de *Muscadinia* par rapport à *Vitis*, mais aussi sur leur lien de parenté, sur la base d'analyses de marqueurs ADN (Di Gaspero *et al.*, 2000; Tröndle *et al.*, 2010). Plusieurs analyses phylogénétiques ont été menées au sein des *Vitaceae*, sur la base de séquences d'ADN chloroplastique (Jansen *et al.*, 2006; Soejima & Wen, 2006), de marqueurs de type plastidique (Tröndle *et al.*, 2010; Nie *et al.*, 2010) ou de régions ITS (Internal transcribed spacer) (Rossetto *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 2011).

Rossetto *et al.* (2002) classent *M. rotundifolia* (syn. *V. rotundifolia*) dans un clade séparé de celui de *V. vinifera*, et regroupent la muscadine avec quatre espèces de *Cissus* australiennes à  $2n=40$  chromosomes. Soejima *et al.* (2006) ont établi que le groupe des *Vitis* (*V. rotundifolia*) est monophylétique (un seul et même ancêtre commun) et forme un clade avec les *Ampelocissus* ( $2n=40$ ), les *Pterisanthes*, et les *Nothocissus*, trois autres genres de *Vitaceae*. Ce résultat a été confirmé par Tröndle *et al.* (2010).

A l'heure actuelle, l'origine de la différence caryotypique observée entre les *Vitis* et *Muscadinia* reste incertaine. Patel et Olmo (1955) ont proposé que le jeu de chromosomes haploïde de *Muscadinia* dériverait de trois génomes ancestraux à  $(6+7) + 7$  et celui de *Vitis* à  $(6+7) + 6$ , aboutissant respectivement à des caryotypes  $n=20$  et  $n=19$ . Depuis plusieurs décennies, beaucoup ont considéré que le genre *Vitis* descendait de *Muscadinia* ou d'un ancêtre de *Muscadinia* par la perte d'une paire de chromosomes (Bouquet, 1983; Olien, 1990; Mullins *et al.*, 1992).

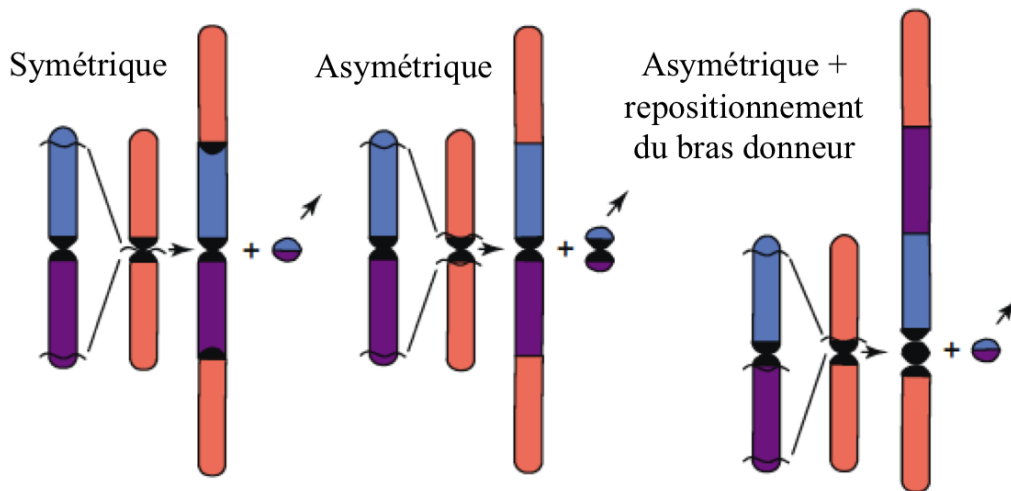
Que sait-t-on à l'heure actuelle sur l'origine du génome des Vitacées ? En publiant une séquence du génome de la vigne, Jaillon *et al.* (2007) ont révélé que la plante dérivait d'un génome ancestral paléo-hexaploïde commun à de nombreuses dicotylédones, et qu'il avait ensuite subi un événement de diploïdisation. Le génome de la vigne possède en effet des régions tripliquées, indiquant la contribution de trois génomes ancestraux au contenu haploïde actuel de la vigne. Sur la représentation schématique du génome de la vigne illustré par la figure 20, le GL7 de *V. vinifera* est composé de deux grands blocs de couleurs différentes, indiquant très vraisemblablement la présence de deux chromosomes distincts chez l'ancêtre commun des *Vitaceae*, qui auraient fusionné pour donner l'actuel GL7 de *V. vinifera*.



**Figure 20.** Représentation schématique des régions paralagues dérivées de trois génomes ancestraux chez *V. vinifera*, d'après Jaillon *et al.* (2007). Les sept couleurs correspondent vraisemblablement à des GL distincts dans le génome ancestral.

Récemment, Abrouk *et al.* (2010) ont réalisé une étude paléogénomique basée sur la comparaison de génomes séquencés de monocotylédones et d'eudicotylédones, dont la vigne. Le génome de la vigne aurait selon eux évolué à partir d'un intermédiaire  $n=21$  (tripliqué à partir d'un ancêtre  $n=7$ ), puis s'en seraient suivies des fusions chromosomiques « imbriquées » (en anglais Nested Chromosome Fusion ou NCF) (Figure 21). Les NCF constituent un mécanisme courant chez les plantes participant à la réduction du nombre de chromosomes. Ce type de fusion a été détecté chez plusieurs espèces de céréales (Luo *et al.*, 2009; Salse *et al.*, 2009; Thiel *et al.*, 2009; Abrouk *et al.*, 2010; Murat *et al.*, 2010), et dans une moindre mesure chez les *Brassicaceae* (Lysak *et al.*, 2005).

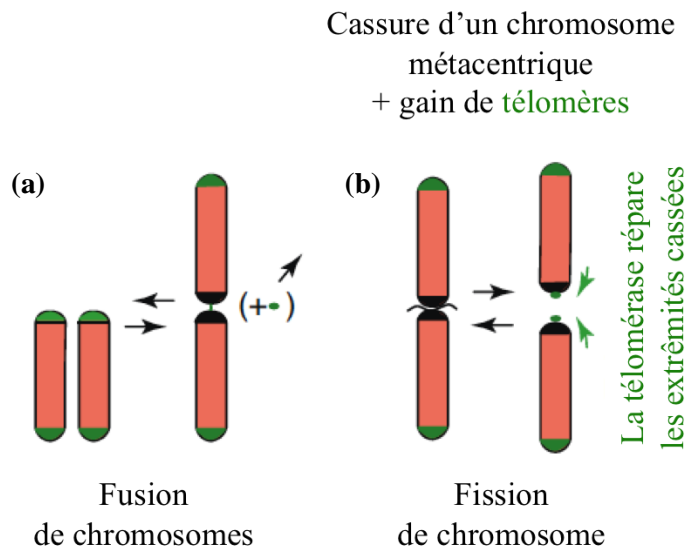
Néanmoins, les résultats obtenus suite à nos travaux de cartographie génétique indiquent qu'un remaniement chromosomique de ce type est très peu probable entre *M. rotundifolia* et *V. vinifera*, en ce qui concerne les GL7 et 20 de la muscadine (voir Figure 18). Puisque la synténie semble parfaitement conservée entre le GL7 de *M. rotundifolia* et la partie supérieure du GL7 de *V. vinifera* d'une part, et le GL20 de *M. rotundifolia* et la partie inférieure du GL7 de *V. vinifera* d'autre part, l'hypothèse la plus probable pour expliquer la différence du nombre de chromosomes entre les deux espèces est l'occurrence d'une fusion ou d'une fission de chromosomes (Figure 22).



**Figure 21.** ‘Nested-fusion’ par translocation réciproque symétrique, asymétrique, ou asymétrique avec repositionnement du bras donneur, d’après Schubert et Lysak (2011). L’un ou l’autre de ces mécanismes se produiraient selon le nombre de cassures double brin interagissant. Les petits fragments acrocentriques sont perdus durant la mitose et la méiose (Schubert & Lysak, 2011).

Au cours d’un évènement de ‘fusion-fission’ chromosomique (réarrangements robertsoniens), une diminution ou une augmentation du nombre de chromosomes peut avoir lieu (Figure 22). Des réarrangements chromosomiques robertsoniens tels que la fusion et la fission centromérique, ont été identifiés comme étant des mécanismes importants dans l’évolution des caryotypes de plantes comme chez les *Rosaceae* (Vilanova *et al.*, 2008) ou chez le haricot (Schubert *et al.*, 1995), et d’animaux tels que les poissons (Hartley & Horne, 1984; Amores *et al.*, 1990) ou certains vers Onychophores (Rowell *et al.*, 2002).

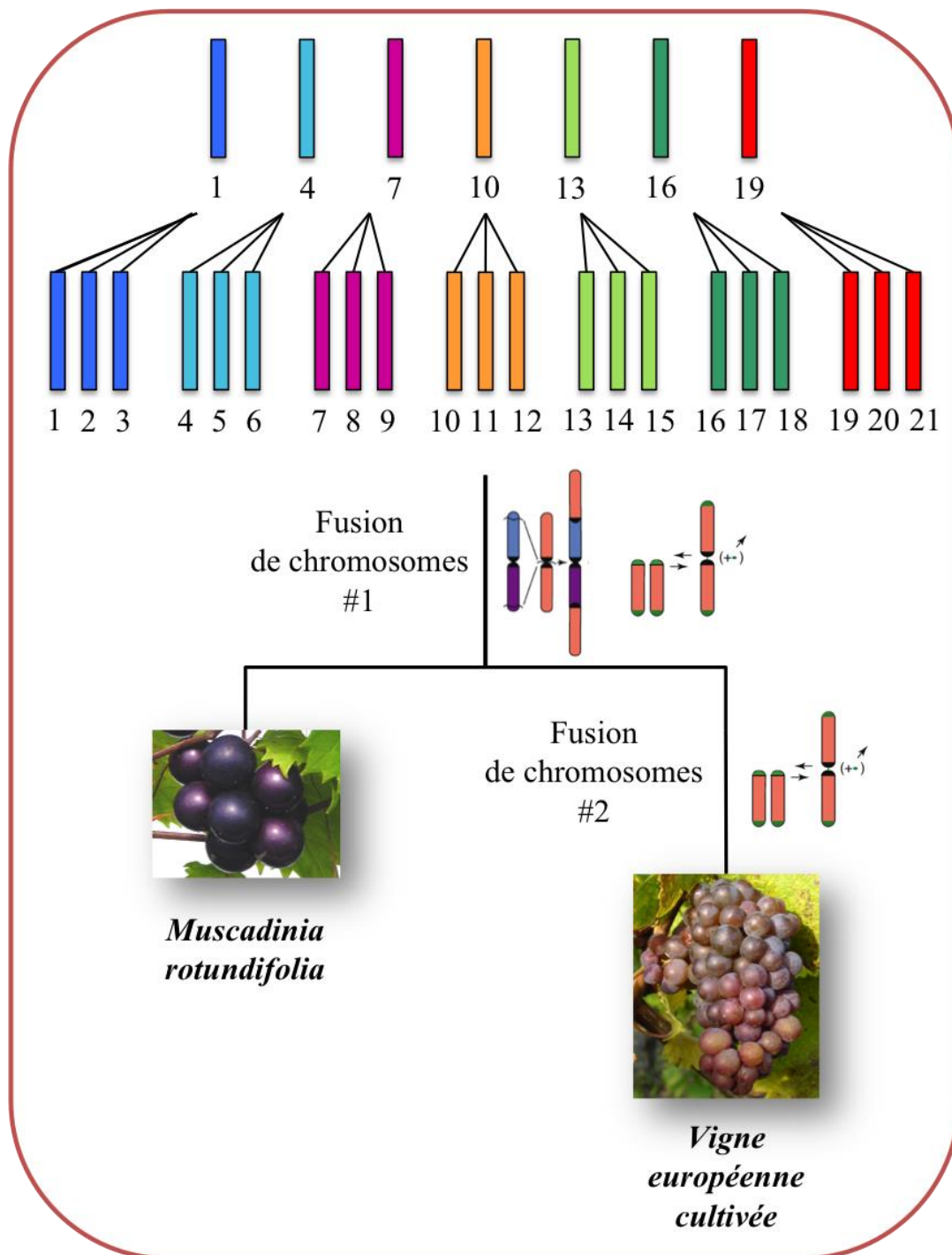
Cette hypothèse est séduisante car elle n’implique pas de réarrangements chromosomiques majeurs à l’intérieur même des chromosomes, ce qui semble être le cas des GL 7 et 20 de *M. rotundifolia*. Pour le moment, il est délicat de conclure sur le sens de l’évolution entre les deux génomes. Néanmoins, la localisation des régions paralogues dérivées de trois génomes ancestraux chez *V. vinifera*, d’après Jaillon *et al.* (2007), oriente davantage en faveur d’une fusion de chromosomes entre *M. rotundifolia* et *V. vinifera*. Un mécanisme de ce type (Figure 22a) permet d’expliquer de façon cohérente la différence caryotypique majeure entre *Muscadinia* et *Vitis* qu’est la séparation du GL7 de *Vitis* en deux GL distincts.



**Figure 22.** Cycle de ‘fusion-fission’ chromosomique, d’après Schubert et Lysak (2011).

La fusion de chromosomes acrocentriques en un seul métacentrique est réversible si les séquences télomériques qui flanquent le centromère restent conservées (a) ; alternativement, un chromosome métacentrique peut se séparer en deux télocentriques stables lorsque les cassures centromériques sont réparées par l’addition de séquences télomériques (b). La télomérase est plus efficace pour initier l’élargissement d’une matrice télomérique lorsque des répétitions télomériques existent au préalable (Schubert & Lysak, 2011). Cependant, des phénomènes de “capture télomérique” par recombinaison (Kostiner *et al.*, 2002) et de synthèse *de novo* de télomères sont impliqués lors de réparations chromosomiques chez *Tetrahymena* (Harrington & Greider, 1991) ou chez le blé (Tsujiimoto *et al.*, 1999) .

Si l’on considère comme exacte l’existence de l’intermédiaire  $n=21$  comme ancêtre à *Vitis* et *Muscadinia* (Abrouk *et al.*, 2010 ; Figure 23) une hypothèse pour expliquer la différence caryotypique entre les deux genres pourrait être la suivante : une première fusion de chromosomes, NCF ou fusion par exemple (Figures 21 et 22a) pourrait avoir eu lieu en amont de *Vitis* et *Muscadinia*, donnant naissance à un ancêtre commun aux deux genres possédant  $n=20$  chromosomes à l’instar de *Muscadinia* ; puis une seconde, postérieure, aboutissant au caryotype des vignes européennes cultivées ( $n=19$ ) et consistant en la fusion des chromosomes 7 et 20 homologues chez *M. rotundifolia* (Figure 23). D’après la représentation schématique des régions paralogues chez *V. vinifera* (Figure 20), le chromosome 4 et le chromosome 14 sont également composés de deux couleurs différentes, et pourraient donc également résulter de fusions chromosomiques ancestrales, dont les mécanismes sous-jacents reste à élucider.



**Figure 23.** Schéma hypothétique expliquant la formation possible des caryotypes de *M. rotundifolia* et *V.vinifera*. Après la triploïdisation d'un ancêtre commun comportant 7 protochromosomes, aboutissant à la formation d'un intermédiaire  $n=21$  chromosomes, on peut imaginer que deux remaniements majeurs impliquant deux fusions de chromosomes successives aient eu lieu pour donner les caryotypes actuels de *M. rotundifolia* ( $n=20$ ) et *V.vinifera* ( $n=19$ ).

## V. Conclusion et perspectives

Une carte génétique de référence couvrant le génome de *M. rotundifolia*, espèce apparentée à la vigne cultivée, a été réalisée dans ce travail à l'aide de marqueurs de type microsatellites. Cette carte, créée à l'aide d'une descendance issue de l'autofécondation de *M. rotundifolia* cv. Regale, couvre 950 cM sur 20 groupes de liaison, ce qui correspond au nombre chromosomique attendu pour la muscadine. La comparaison des cartes génétiques de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* a révélé un niveau de macrosynténie très élevé entre les génomes des deux espèces. Le groupe de liaison 20 de *M. rotundifolia* correspond à la moitié inférieure du chromosome 7 de *V. vinifera*.

La carte génétique établie dans ce travail apporte des informations utiles pour l'assemblage de la carte physique de *M. rotundifolia* en cours de réalisation à l'URGV (Evry, France). Inversement, l'établissement d'une carte physique permet la mise à disposition de séquences génomiques de *M. rotundifolia* pouvant servir de sonde dans des expériences d'hybridation in situ en fluorescence (en anglais FISH, pour Fluorescence In Situ Hybridization). Les expériences de FISH utilisent des sondes marquées à l'aide d'un fluorochrome pour repérer des régions génomiques particulières sur des coupes en microscopie de chromosomes en mitose ou en méiose (stade pachytène). La réalisation de ce type d'expérimentations permettrait de confirmer l'identification du GL20 de *M. rotundifolia* comme étant le chromosome 20 de la muscadine. Ainsi, une collaboration a été établie avec la plateforme de Cytogénétique Moléculaire de l'INRA de Rennes (Olivier Coriton), qui possède les outils et techniques adaptés à la méthode d'hybridation in situ. Des expériences préliminaires de FISH ont été réalisées sur *M. rotundifolia* et sur *V. vinifera*, en utilisant comme sondes des clones BAC issus de la construction de la carte physique de *M. rotundifolia* (URGV, Evry, France), situés sur le GL7 et sur le GL20 de *M. rotundifolia*. Les premiers résultats indiquent que si chez *V. vinifera*, les sondes allument une même région chromosomique (même chromosome), chez *M. rotundifolia* des zones tout à fait distinctes du caryotype s'allument. Bien qu'il s'agisse là d'expérimentations préliminaires, ces résultats sont très encourageants et indiquent que, selon toute vraisemblance, le GL20 de *M. rotundifolia* constitue le chromosome 20 de l'espèce.



D'autre part, des SNP spécifiques à la muscadine sont en train d'être générés par l'URGI (Evry, France). L'intégration de ces marqueurs aux deux cartes génétiques disponibles aujourd'hui pour *M. rotundifolia* permettra d'augmenter la couverture et la précision de la carte. Ainsi, un projet visant à l'intégration de ces SNP et des données des cartes génétiques issues de 'Regale' et de 'Fry' x 'Trayshed' (Riaz *et al.*, 2012) est en cours. Cette collaboration donnera lieu à l'établissement d'une carte génétique consensus pour la muscadine, beaucoup plus dense en marqueurs et plus informative.

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, les informations génétiques générées par la cartographie seront intégrées à des données phénotypiques concernant le niveau de résistance de *M. rotundifolia* au mildiou et à l'oïdium, pour permettre la mise en évidence des loci responsables de ces résistances chez *M. rotundifolia*.

PARTIE B :

DETECTION DE QTL DE  
RESISTANCE AU MILDIOU ET  
A L'OÏDIUM CHEZ  
*MUSCADINIA ROTUNDIFOLIA*



## **PARTIE B: DETECTION DE QTL DE RESISTANCE AU MILDIOU ET A L'OÏDIUM CHEZ *MUSCADINIA ROTUNDIFOLIA***

### **I. Introduction**

Dans la partie A, nous avons reporté la construction d'une carte génétique de référence pour *M. rotundifolia*. Cette carte constitue une base essentielle vers une meilleure connaissance de l'organisation du génome de *Muscadinia*. Mais elle est également l'étape préalable nécessaire pour la détection des QTL impliqués dans la résistance de cette espèce au mildiou et à l'oïdium. Une analyse QTL requiert une évaluation de la variabilité phénotypique observée dans la population qui a servi à construire la carte génétique, afin de mettre en relation les données génotypiques (variations alléliques) et phénotypiques (distribution des caractères), et ainsi identifier les régions génomiques impliquées dans la résistance. Une évaluation phénotypique des individus de la population '42055' vis à vis de leur résistance à *P. viticola* et *E. necator* a donc été réalisée, puis une recherche de QTL de résistance a été effectuée en associant les données génotypiques et phénotypiques générées pour la population '42055'.

### **II. Matériel et méthodes**

#### **II.1 Matériel végétal**

La population utilisée pour l'évaluation phénotypique et la détection des QTL est la population de cartographie '42055', issue de l'autofécondation *M. rotundifolia* cv. Regale (détails dans la Partie A).

Les accessions employées comme témoins dans les expériences sont *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon clone 338 ou CS 338, *V. vinifera* cv. Cinsault, *V. rupestris* cv. Du Lot, *V. riparia* cv. Gloire de Montpellier et *M. rotundifolia* cv. Regale. Les 'CS338', 'Cinsault', 'rupestris' et 'riparia' sont issues de boutures herbacées, et maintenues en serre à l'INRA de Colmar. Le parent de la population de cartographie 'Regale' provient des plantes en serre du conservatoire de muscadine de l'INRA de Colmar, qui sont conduites en containers de manière pérenne.

### ***II.2.1 Evaluation phénotypique de la résistance au mildiou***

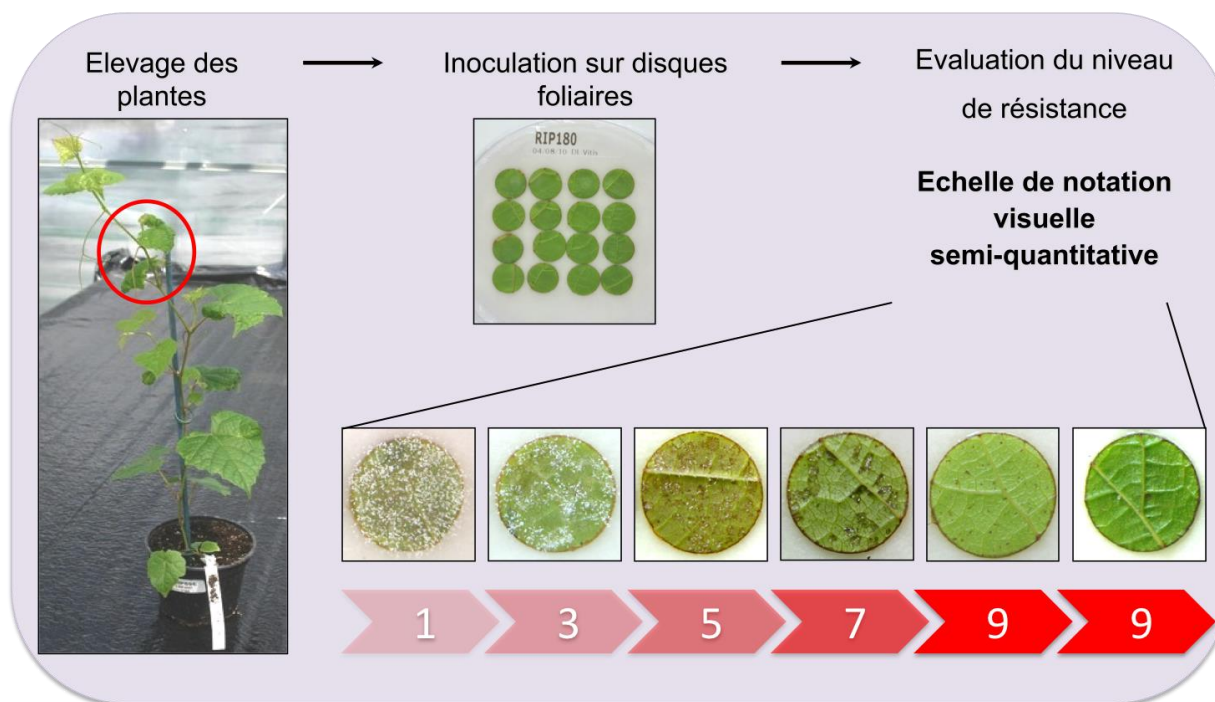
#### ***a) Matériel infectieux et entretien de la souche***

La souche de *P. viticola* utilisée dans ce travail a été récoltée sur *V. vinifera* cv. Chardonnay dans un vignoble expérimental de l'INRA de Colmar (France) en 2006. Le mildiou est un parasite biotrophe obligatoire qui doit être entretenu régulièrement sur du matériel végétal vivant. A l'INRA de Colmar, la souche est maintenue sur des plantules de six semaines issues de *V. vinifera* cv. Muscat Ottonel placées dans une boîte en carton ouverte recouverte d'un sac en plastique, appelée « mini serre ». Cinq à six jours après inoculation et incubation en chambre climatique (21°C, période 16h de lumière/8h à l'obscurité, 80% d'humidité relative, 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  d'intensité lumineuse), des sporanges apparaissent sur les feuilles infectées et un nouvel inoculum est produit par immersion de feuilles infectées dans de l'eau sous agitation douce. La concentration de la suspension de *P. viticola* est mesurée dans une chambre de comptage cellulaire. La face abaxiale des jeunes feuilles est inoculée avec une suspension aqueuse d'environ  $10^5$  sporanges/ml.

#### ***b) Réalisation du phénotypage***

Les 4ème et 5ème feuilles à partir de l'apex sont prélevées sur les plantes à phénotyper (généralement au stade 10 feuilles) (Figure 24). Les feuilles sont rincées à l'eau, puis 16 disques foliaires de 10 mm de diamètre sont découpés et placés en survie dans une boîte de Pétri contenant un papier filtre humide, face adaxiale du disque en contact avec le filtre (Figure 24). La face abaxiale des disques foliaires est ensuite inoculée avec un spray contenant une suspension de sporanges à  $10^5$  sporanges/ml, puis les boîtes sont placées pendant 6 jours dans la chambre climatisée à 21°C. Six jours après inoculation (jpi), les disques foliaires inoculés sont évalués pour le niveau de résistance général des plantes (OIV452), la sporulation du champignon (S), la présence de nécroses (NEC) et le nombre de disques nécrotiques (DN) (Figure 24, Tableau 13). Deux répétitions ont été réalisées pour chaque individu de la population '42055', et 9 répétitions pour chaque contrôle.

Deux répétitions biologiques ont été réalisées en 2009 et 2010. En 2009, 137 individus ont été évalués pour leur résistance au mildiou, et en 2010 112 individus.



**Figure 24.** Principales étapes de l'évaluation phénotypique de plantes pour leur résistance au mildiou. L'échelle de notation utilisée va de 1 (très sensible) à 9 (très résistant).

Nom du paramètre	Description	Notation
<b>OIV452</b>	Echelle de notation visuelle semi-quantitative de la résistance au mildiou, adaptée à partir des critères de l'Office International de la Vigne et du Vin (OIV ; Anonyme 2009)  <a href="http://www.oiv.int/oiv/info/frplubicationoiv#listdesc">http://www.oiv.int/oiv/info/frplubicationoiv#listdesc</a>	De <b>1</b> (très sensible) à <b>9</b> (totalement résistant):  <b>1</b> = sporulation abondante et dense couvrant toute la surface du disque, absence de nécrose <b>3</b> = sporulation abondante présente en larges tâches, absence nécrose <b>5</b> = sporulation limitée présente en tâches entre les nervures, nécroses sous forme de tâches ou de points <b>7</b> = sporulation éparse, spots nécrotiques <b>9</b> = absence de sporulation et de nécrose
<b>S</b>	Présence de sporulation	1 = sporulation 0 = absence de sporulation
<b>NEC</b>	Présence de nécrose	1 = nécroses 0 = absence de nécroses
<b>DN</b>	Nombre de disques nécrotiques	1 à 16

**Tableau 13.** Description des paramètres utilisés pour évaluer le niveau de résistance au mildiou dans la population '42055'.

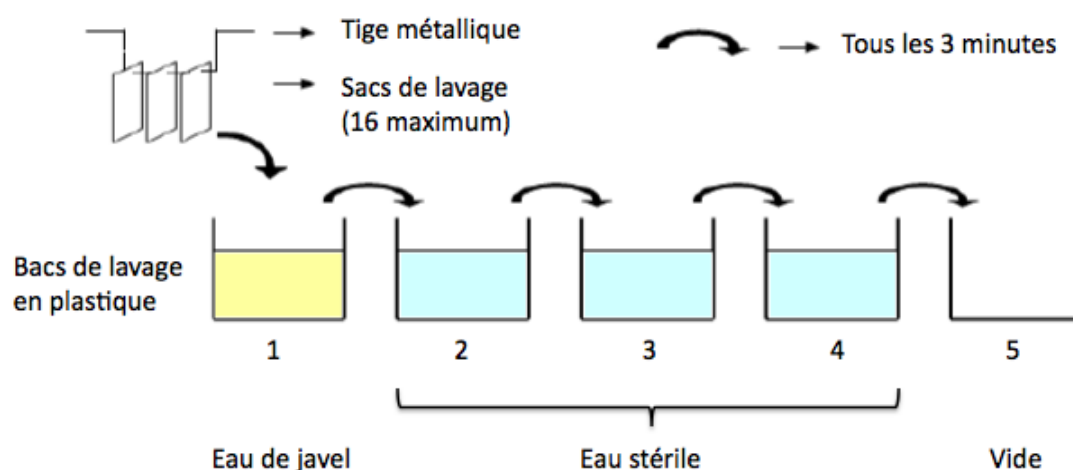
## II.2.2 Evaluation phénotypique de la résistance à l'oïdium

### a) Matériel infectieux et entretien de la souche

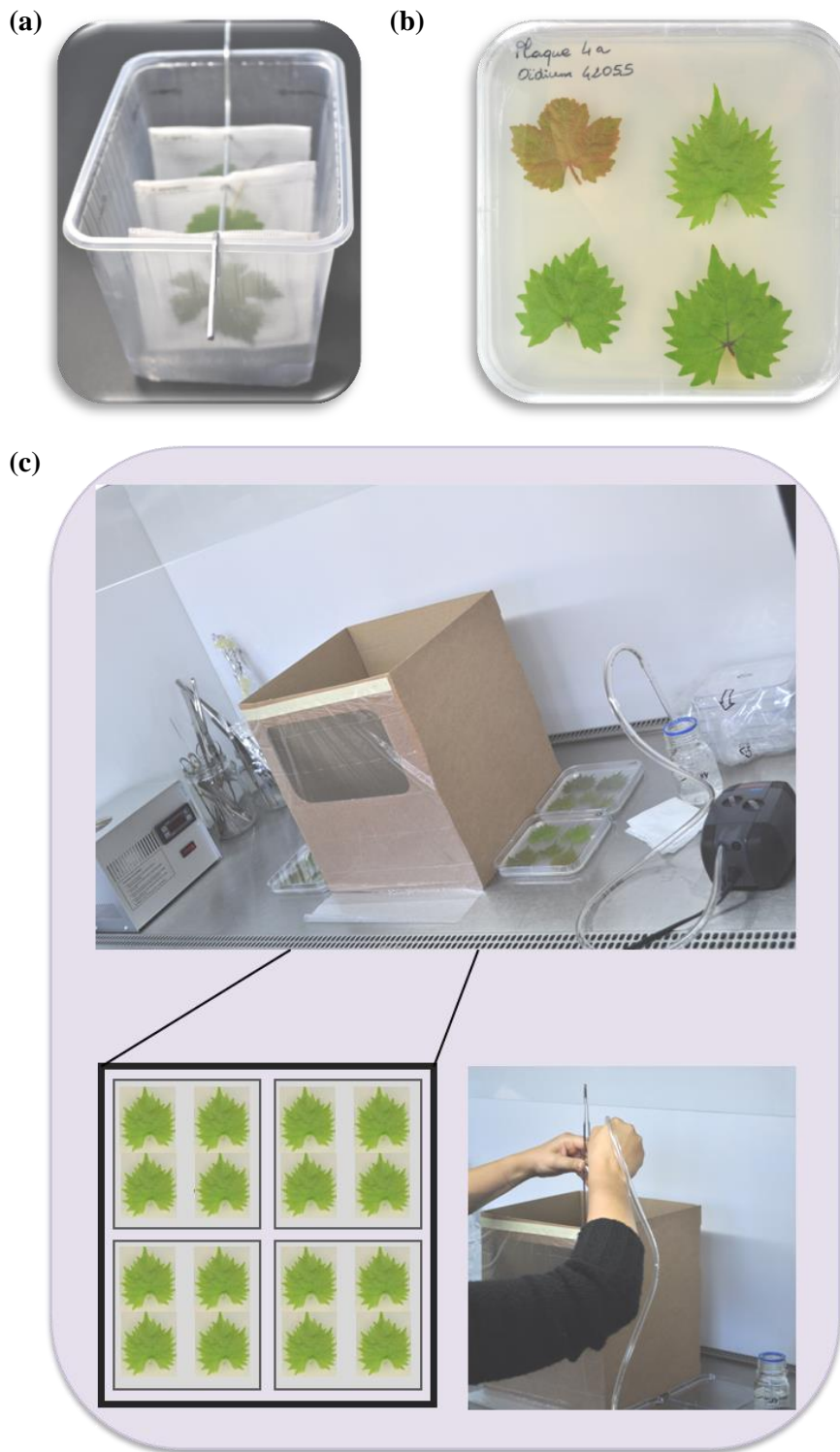
Les expériences ont été réalisées avec la souche d'*E. necator* Chlo2b (biotype B) récoltée sur *V. vinifera* cv. Merlot Noir à Pauillac (Gironde, France) en 2004 et maintenue sur jeunes feuilles détachées provenant de boutures en vert de *V. vinifera* cv. Muscat Ottonel ou Cinsault.

Les feuilles sont plongées dans quatre bains successifs de 3 minutes chacun : un d'eau de javel diluée (2,6% de chlore actif) puis trois d'eau stérile (Figure 25), et placées dans des sacs de lavage à maillage lâche laissant passer les liquides (Figure 26a). Elles sont ensuite séchées entre deux feuilles de papier buvard, et installées dans des boîtes de culture carrées remplies d'un mélange agar à 15g/L et benzimidazole (antifongique) à 40g/L, de sorte à ce que le pétiole trempe dans la gélose (Figure 26b). Cela permet de maintenir la feuille artificiellement en vie une dizaine de jours.

L'inoculation est effectuée comme décrit dans Miclot *et al.* (2011), en conditions sèches et sous hotte stérile, dans une tour d'inoculation au sein de laquelle on crée un flux d'air destiné à répartir les conidies de manière homogène sur les feuilles à inoculer (Figure 26c). Puis les boîtes de culture sont parafilmées et mises en incubation dix à douze jours en chambre climatique (21°C, période 16h de lumière/8h à l'obscurité, 80% d'humidité relative, 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  d'intensité lumineuse) (Figure 27).

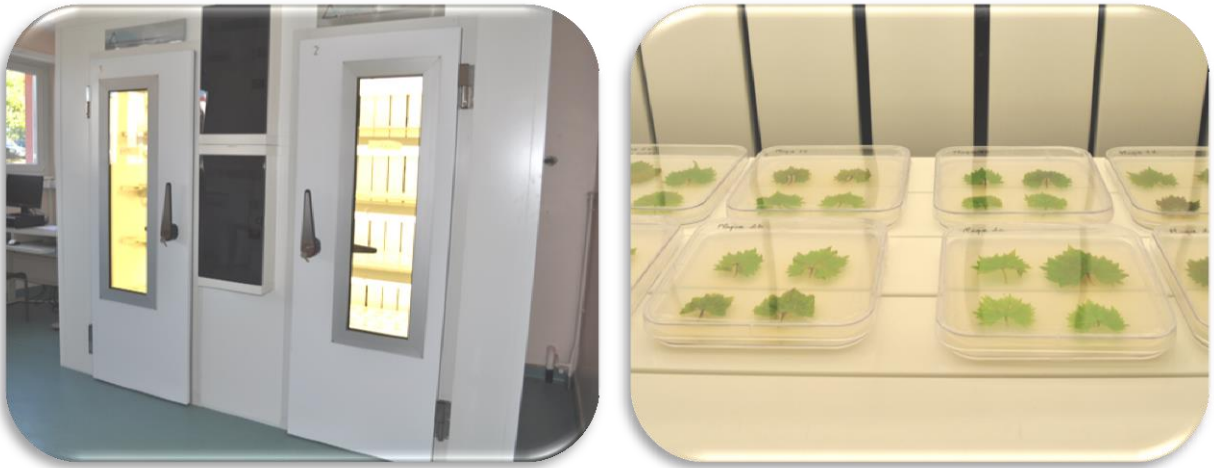


**Figure 25.** Schéma illustrant les étapes de désinfection préalable à l'inoculation des feuilles à infecter. Le 1<sup>er</sup> bac est rempli d'eau de javel, les 3 suivants d'eau stérile, et le dernier est vide et sert juste à égoutter les feuilles avant de les sécher entre 2 papiers buvards stériles.

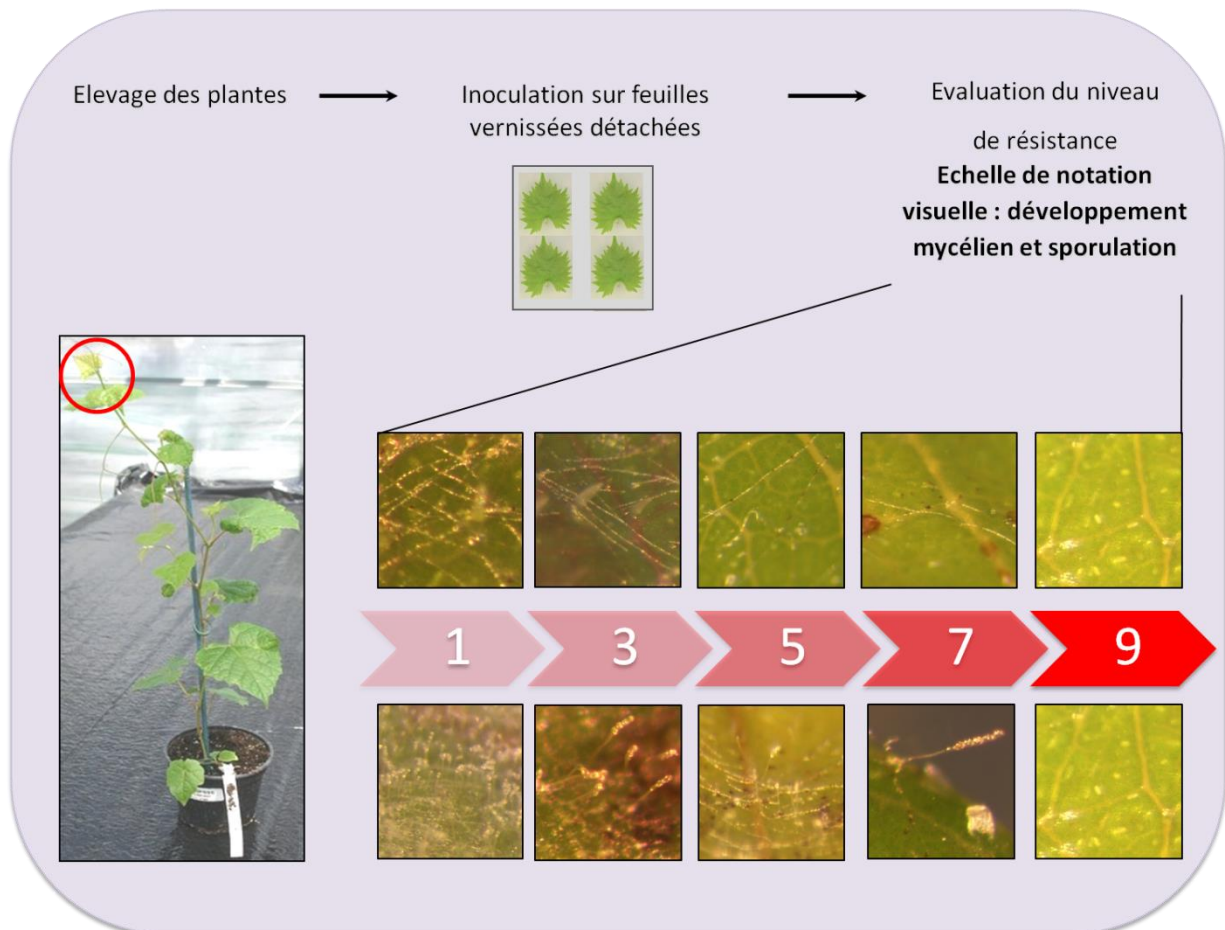


**Figure 26.** Illustration du matériel et du mode opératoire utilisés pour les inoculations d’oïdium. (a) Les sacs de lavage sont tenus par une tige métallique pour faciliter le trempage des feuilles dans les bains successifs. (b) Les feuilles séchées sont placées dans des boîtes de culture carrées contenant de l’agar, le pétiole trempant dans la gélose. (c) Quatre boîtes contenant chacune 4 feuilles vernissées sont placées à la base d’une tour d’inoculation en carton, sous hotte stérile. Une feuille infestée d’oïdium est secouée au-dessus de la tour avec ajout d’un flux d’air.





**Figure 27.** Deux enceintes à thermoplans assurent la réalisation des expérimentations sous éclairage contrôlé et à température constante.



**Figure 28.** Principales étapes de l'évaluation phénotypique de plantes pour leur résistance à l'oïdium. L'échelle de notation utilisée va de 1 (très sensible) à 9 (très résistant).

***b) Réalisation du phénotypage***

Deux jeunes feuilles vernissées sont prélevées par génotype (Figure 28). La préparation et l'inoculation des feuilles se déroule de la même manière que lors de l'entretien de la souche (Figures 25 et 26). Quatre boîtes de culture sont installées par tour d'inoculation, contenant chacune 4 feuilles. Chaque tour d'inoculation contient systématiquement un témoin sensible (*V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon 338 ou Cinsault) et un témoin résistant (*M. rotundifolia* cv. Regale). Par conséquent chaque tour permet, à raison de 2 feuilles par génotype, de phénotyper 7 génotypes. Les boîtes sont ensuite parafilmées et placées dans une chambre climatisée à 25°C (période 16h de lumière/8h à l'obscurité, 80% d'humidité relative, 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  d'intensité lumineuse) (Figure 27).

Les feuilles inoculées ont été évaluées pour leur niveau de résistance à l'oïdium sous une loupe binoculaire (grossissement x25) pour les deux paramètres de résistance semi-quantitatifs décrits par Miclot *et al.* (2011) (Figure 28 ; Tableau 14) : le développement du mycélium d'*E. necator* (MYC) et l'intensité de la sporulation du champignon (SPO). Les observations ont été effectuées tous les jours, de 3 à 7 jpi. Les notations réalisées à 7 jpi ont donné les résultats les plus discriminants, et ont donc été retenus pour les analyses QTL réalisées dans ce travail.

Deux répétitions biologiques ont été réalisées en 2010 et 2011. En 2010, 126 individus ont été évalués pour leur résistance à l'oïdium, et en 2011 105 individus.

<b>Nom du paramètre</b>	<b>Description</b>	<b>Notation</b>
<b>MYC</b>	Echelle de notation visuelle semi-quantitative du développement mycélien à la surface de la feuille	<p>De <b>1</b> (très sensible) à <b>9</b> (totalement résistant) :</p> <p><b>1</b> = mycélium généralisé dense recouvrant l'ensemble de la feuille</p> <p><b>3</b> = mycélium généralisé et localement dense</p> <p><b>5</b> = mycélium généralisé et peu dense</p> <p><b>7</b> = mycélium épars et peu dense</p> <p><b>8</b> = rares et très courts hyphes de mycélium</p> <p><b>9</b> = absence de développement mycélien</p>
<b>SPO</b>	Echelle de notation visuelle semi-quantitative de l'intensité de la sporulation	<p>De <b>1</b> (très sensible) à <b>9</b> (totalement résistant) :</p> <p><b>1</b> = sporulation généralisée avec haute densité de conidiophores</p> <p><b>3</b> = sporulation généralisée avec densité variable de conidiophores</p> <p><b>5</b> = sporulation épars avec densité variable de conidiophores</p> <p><b>7</b> = sporulation épars avec densité faible de conidiophores</p> <p><b>8</b> = rares conidiophores</p> <p><b>9</b> = absence de sporulation</p>

**Tableau 14.** Description des paramètres utilisés pour évaluer le niveau de résistance à l'oïdium dans la population '42055', d'après Miclot *et al.* (2011).

### **II.3 Détection des QTL**

Le logiciel MapQTL®6.0 (Van Ooijen, 2009) a été utilisé pour la détection de QTL de résistance au mildiou et à l'oïdium dans la population '42055'. Les informations concernant la détermination des phases de liaison génétique et la position des marqueurs sur chaque groupe de liaison ont été obtenues grâce au logiciel JoinMap®3.0 (Van Ooijen & Voorrips, 2001).

Les outils statistiques employés pour la recherche de QTL sont le test de Kruskal-Wallis (Lehmann, 1975), et la cartographie d'intervalle, SIM et MQM (détails dans l'introduction bibliographique, paragraphe *IV.1.2 d*). Pour fixer le seuil de détection des QTL, des tests de permutation ont été réalisés : les valeurs phénotypiques sont permutées mille fois au hasard. La distribution des statistiques calculées sur les données réellement observées est alors comparée à la distribution des statistiques calculées à partir des données redistribuées au hasard, permettant de définir un seuil de significativité pour rejeter les « faux QTL ». Ces tests ont été effectués pour chaque groupe de liaison. Les seuils ont été établis en prenant en compte le seuil de significativité de 5%, ce qui signifie que la probabilité de trouver par hasard un LOD score au dessus des seuils de détection des QTL est seulement de 5%.

Les calculs d'héritabilité des caractères ont été réalisés avec le logiciel R© (R Development Core Team, 2005).

### III. Résultats

#### III.1 Analyse de la résistance au mildiou chez *M. rotundifolia*

##### III.1.1. Analyse des données phénotypiques

La fiabilité du phénotypage pour la résistance au mildiou dans la population '42055' a été évaluée en notant les quatre paramètres de résistance OIV452, S, NEC et DN dans des plantes témoin, qui représentent un éventail de niveaux de résistance allant de sensible à très résistant : 'Cabernet Sauvignon 338' (sensible), 'Rupestris du Lot' et 'Riparia Gloire de Montpellier' (tous deux partiellement résistants) et 'Regale' (le parent totalement résistant de la population de cartographie '42055'). Toutes les plantes contrôle, ainsi que le parent de la population S1, se sont comportés comme attendu concernant les paramètres de résistance testés (Tableau 15).

	OIV452	S	NEC	DN
Muscat Ottonel seedlings	2,3±1,1	1,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Cabernet Sauvignon 338	3,9±1,1	1,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
<i>V. rupestris</i> 'du Lot'	4,1±1,6	1,0±0,0	0,3±0,3	5,3±5,2
<i>V. riparia</i> 'Gloire de Montpellier'	7,7±0,6	0,8±0,3	1,0±0,0	16,0±0,0
<i>M. rotundifolia</i> cv. Regale	9,0±0,0	0,0±0,0	0,8±0,4	11,2±6,3

**Tableau 15.** Valeurs moyennes et intervalles de confiance des critères OIV452, S, NEC et DN chez les contrôles et le parent de la population pour la résistance au mildiou, en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques (n=9).

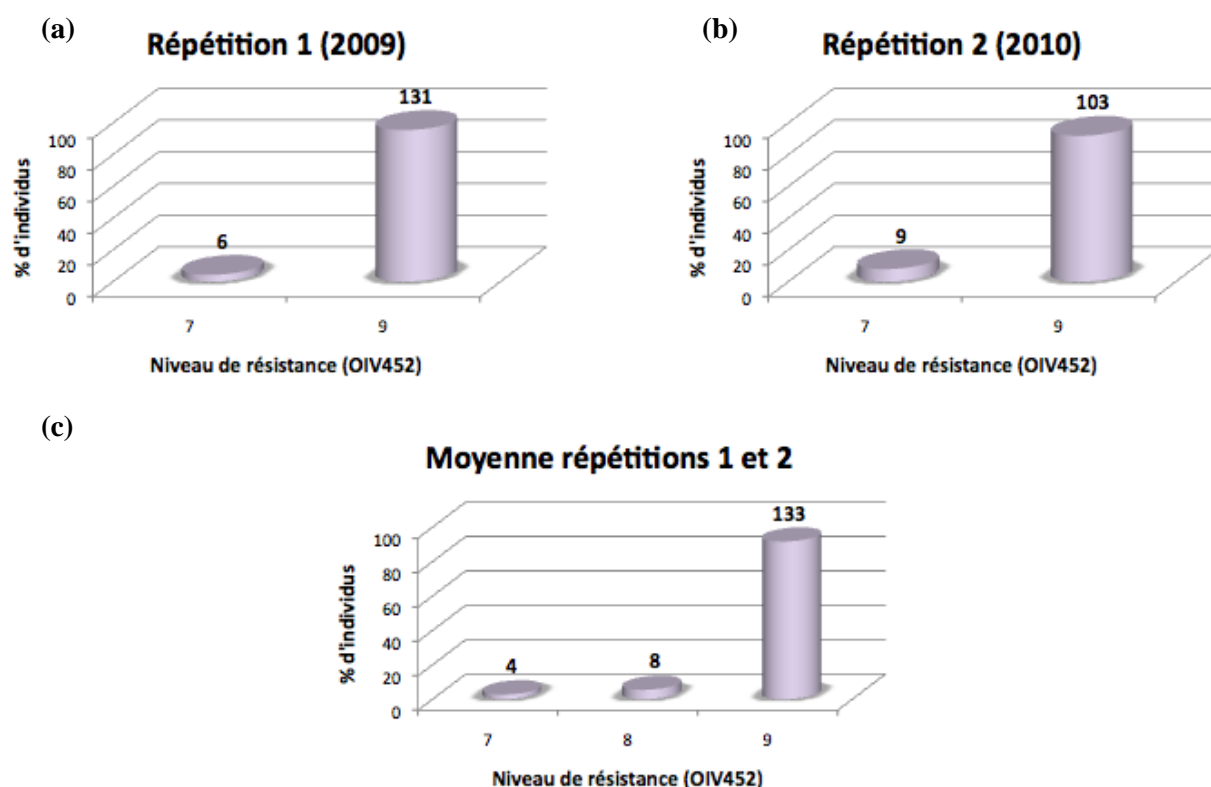
L'héritabilité au sens large, mesure directe des effets environnementaux sur la variance phénotypique, a été calculée pour les quatre caractères notés dans la population '42055'. Pour NEC et DN, elle est égale à 0, ce qui signifie que la part de variance phénotypique expliquée par le génotype pour les paramètres de nécrose est nulle. Par contre, le facteur génétique a un effet hautement significatif ( $P < 0.001$ ) sur l'OIV452 et S. Pour ces deux paramètres, l'héritabilité a été estimée à 0.53. Les paramètres sont parfaitement corrélés : la note OIV452 des individus de la population '42055' repose directement sur leur capacité à sporuler. Dans ce cas la sporulation est cependant rare et faible, avec présence d'un ou quelques conidiophores sur le disque sporulant. Dans la suite des résultats, seul le l'OIV452 sera pris en compte, puisque les paramètres OIV452 et S sont redondants.

## PARTIE B

La résistance au mildiou a présenté une très faible variation dans la population '42055', qui montre globalement une résistance très élevée à *P. viticola*. La distribution de l'OIV452 dans la population '42055' s'est échelonnée de 7.0 à 9.0 (Tableau 16). En moyenne, plus de 90% des individus de la population ont montré une résistance totale (OIV9), à l'instar du parent 'Regale', la part restante montrant une résistance partielle de très haut niveau (Figure 29).

	OIV452
Moyenne	8,89
Minimum	7,00
Maximum	9,00
Déviation standard	0,39
Héritabilité	0,53

**Tableau 16.** Paramètres statistiques descriptifs pour le paramètre OIV452 dans la population '42055', en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques (n=145).



**Figure 29.** Distribution en pourcentages de la résistance au mildiou dans la population '42055', pour le paramètre OIV452, pour (a) la première répétition biologique, n=137 (b) la seconde répétition biologique, n=112 (c) la valeur moyenne des deux répétitions biologiques, n=145. Les chiffres situés au-dessus des barres des histogrammes indiquent les effectifs par classe.

**III.1.2. Analyse QTL**

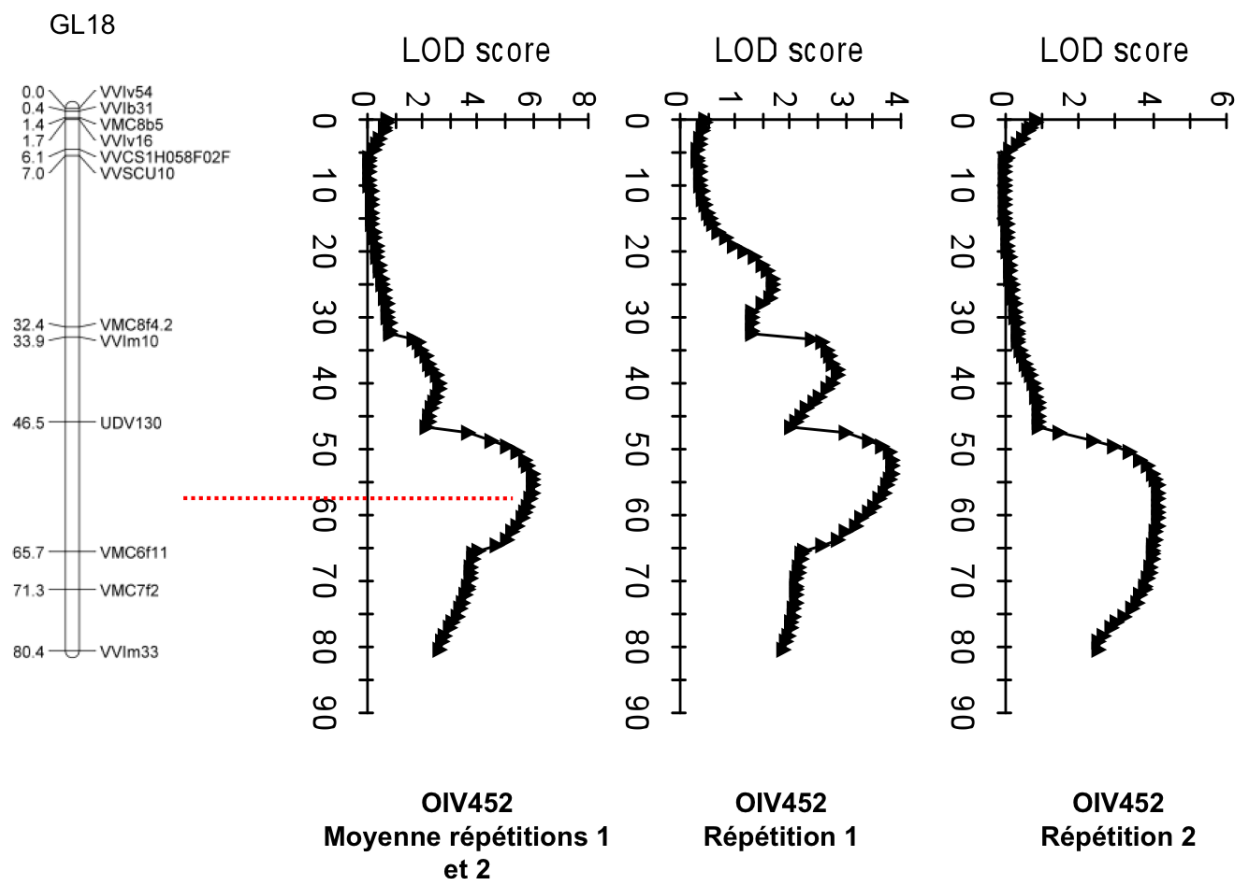
Malgré les faibles différences phénotypiques observées, quatre marqueurs situés sur le GL18 ont été trouvés significativement liés à la résistance ( $P < 0.005$ ) avec le test de Kruskal-Wallis (Tableau 17). Deux de ces marqueurs, VMC6f11 et VMC7f2, ont obtenu le plus haut niveau de liaison statistique possible avec le logiciel utilisé ( $P < 0.0001$ ).

L'analyse en cartographie d'intervalle a permis de détecter un QTL contrôlant la résistance au mildiou dans la même région chromosomique que celle mise en évidence par le test de Kruskal-Wallis (Figure 30 ; Tableau 18). Ce QTL a été détecté aussi bien en considérant la moyenne des deux répétitions biologiques effectuées que pour les deux répétitions biologiques prises séparément (Figure 30). Ce locus représente près de 25% de la variation phénotypique pour l'OIV452 (LOD score 6,06), soit 46,6% de la variance génétique, en considérant une héritabilité au sens large estimée à 53%. Il est situé dans une région couvrant un intervalle de confiance de 18 cM, le marqueur VMC6f11 étant le marqueur plus proche du pic du QTL (Tableau 18).

GL	Position le long du GL (cM)	Marqueur microsatellite	Niveau de probabilité significative
18	0,000	VVIv54	-
18	0,427	VVIb31	-
18	1,397	VMC8b5	-
18	1,730	VVIv16	-
18	6,102	VVCS1H058F02F	-
18	6,970	VVSCU10	-
18	32,382	VMC8f4.2	*
18	33,886	VVIIm10	***
18	46,548	UDV130	****
18	65,733	VMC6f11	*****
18	71,282	VMC7f2	*****
18	80,426	VVIIm33	****

**Tableau 17.** Résultat du test de Kruskal-Wallis effectué pour le paramètre OIV452, en considérant la moyenne des deux répétitions biologiques effectuées.

\*= $P < 0.1$  ; \*\*= $P < 0.05$  ; \*\*\*= $P < 0.01$  ; \*\*\*\*= $P < 0.005$  ; \*\*\*\*\*= $P < 0.001$  ; \*\*\*\*\*= $P < 0.0005$  ;  
\*\*\*\*\*= $P < 0.0001$



**Figure 30.** Localisation du QTL de résistance au mildiou sur le GL18 de *M. rotundifolia* en analyse par cartographie d'intervalle (SIM), pour le paramètre OIV452. Le pic du QTL se situe entre les marqueurs UDV130 et VMC6f11. La courbe reste au-dessus du seuil obtenu avec les tests de permutations, fixé à 2,5 pour le GL18 avec la moyenne des répétitions (données non représentées).

Caractère	Groupe de liaison	Marqueur le plus proche	Position du pic	Intervalle LOD 2	LOD score	Pourcentage de variance phénotypique expliquée	Pourcentage de variance génétique expliquée
OIV	18	VMC6f11	55,5	47,5 - 65,5	6,06	24,7	46,6

**Tableau 18.** QTL de résistance à *P. viticola* détecté dans la population '42055'. La colonne 'Intervalle LOD2' désigne les positions correspondant au LOD score du QTL -2, soit l'intervalle de confiance du pic du QTL.



### III.2 Analyse de la résistance à l'oïdium chez *M. rotundifolia*

#### III.2.1. Analyse des données phénotypiques

La fiabilité du phénotypage pour la résistance à l'oïdium de la population '42055' a été évaluée en notant les paramètres de résistance MYC et SPO dans les plantes témoin 'Cabernet Sauvignon 338' ou 'Cinsault' (sensibles), et 'Regale' (le parent totalement résistant de la population de cartographie '42055'). Toutes les plantes contrôle ainsi que le parent de la population se sont comportés comme attendu concernant les deux paramètres de résistance évalués dans ce travail (Tableau 19).

	MYC	SPO
Cabernet Sauvignon 338	1,7±0.5	1,7±0.5
Cinsault	1,9±0.5	2,8±0.9
<i>M. rotundifolia</i> cv. Regale	8,2±0.1	9,0±0.0

**Tableau 19.** Valeurs moyennes et intervalles de confiance des critères MYC et SPO chez les contrôles et le parent de la population pour la résistance à l'oïdium, en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques ('CS338', n=15 ; 'Cinsault', n=18 ; 'Regale', n=29).

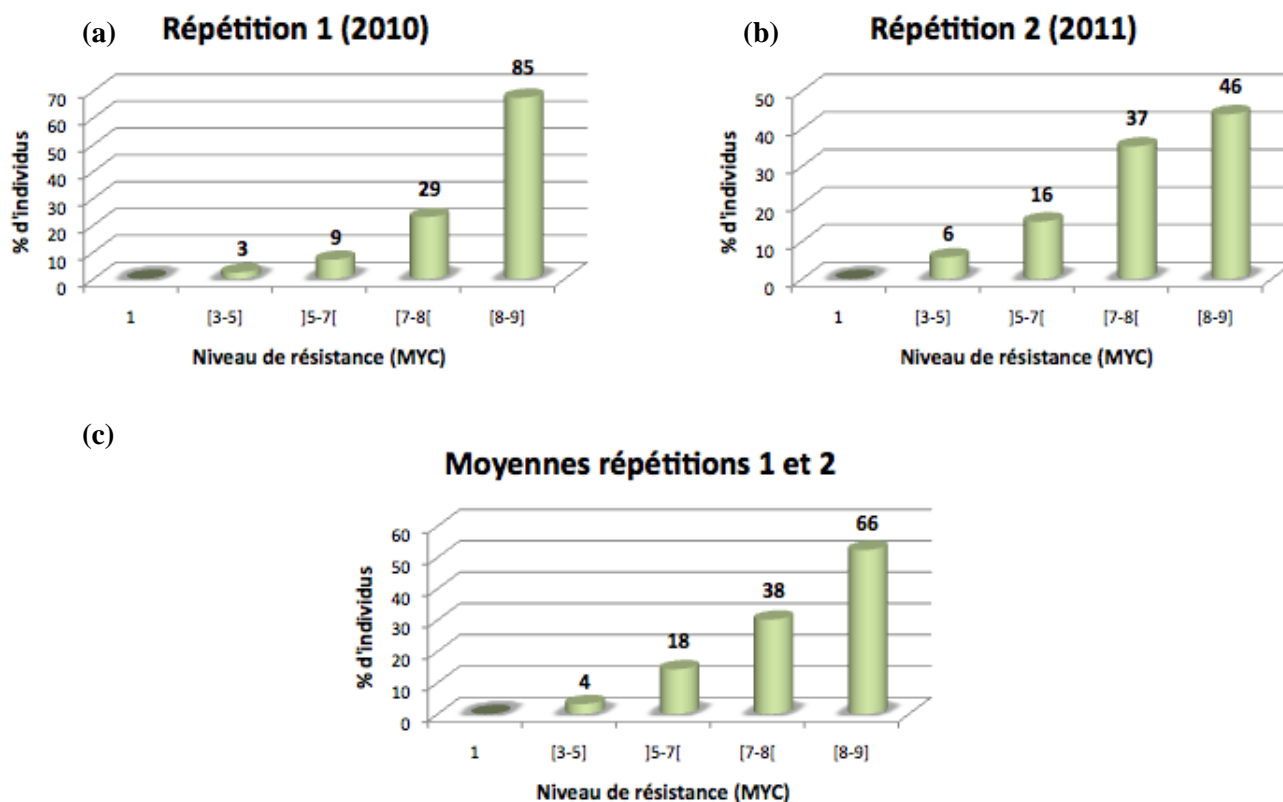
Dans la population '42055', le facteur génétique a un effet hautement significatif ( $P < 0.001$ ) sur les notations MYC et SPO. L'héritabilité au sens large a été calculée pour les deux paramètres phénotypiques évalués, et a été estimée à 0,73 pour MYC, et 0,52 pour SPO (Tableau 20).

La résistance à l'oïdium a montré dans la population '42055' une variation continue, ségrégeant comme un caractère quantitatif, pour le paramètre de développement mycélien MYC. La distribution de MYC dans la population s'est étalée de 3,5 à 9 (Tableau 20 ; Figure 31), en considérant la moyenne des deux répétitions biologiques effectuées aussi bien que les deux répétitions prises indépendamment.

Les individus les plus sensibles ont montré un niveau de résistance partiel, tandis que les plus résistants étaient totalement résistants, à l'instar du parent 'Regale'. Cinquante pourcent des individus ont montré une résistance totale ou quasi-totale à l'oïdium (notation MYC supérieure ou égale à 8), tandis que la part restante de la population a montré des niveaux variés de résistance partielle (Figure 31).

	MYC	SPO
Moyenne	7,62	8,95
Minimum	3,50	7,50
Maximum	9,00	9,00
Déviation standard	0,94	0,21
Héritabilité	0,73	0,52

**Tableau 20.** Paramètres statistiques descriptifs pour les paramètres de résistance à l'oïdium MYC et SPO dans la population '42055', en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques (n=126).



**Figure 31.** Distribution en pourcentages de la résistance à l'oïdium dans la population '42055', pour le paramètre MYC, pour (a) la première répétition biologique, n=126 (b) la seconde répétition biologique, n=105 (c) la valeur moyenne des deux répétitions biologiques, n=126. Les chiffres situés au-dessus des barres des histogrammes indiquent les effectifs par classe.

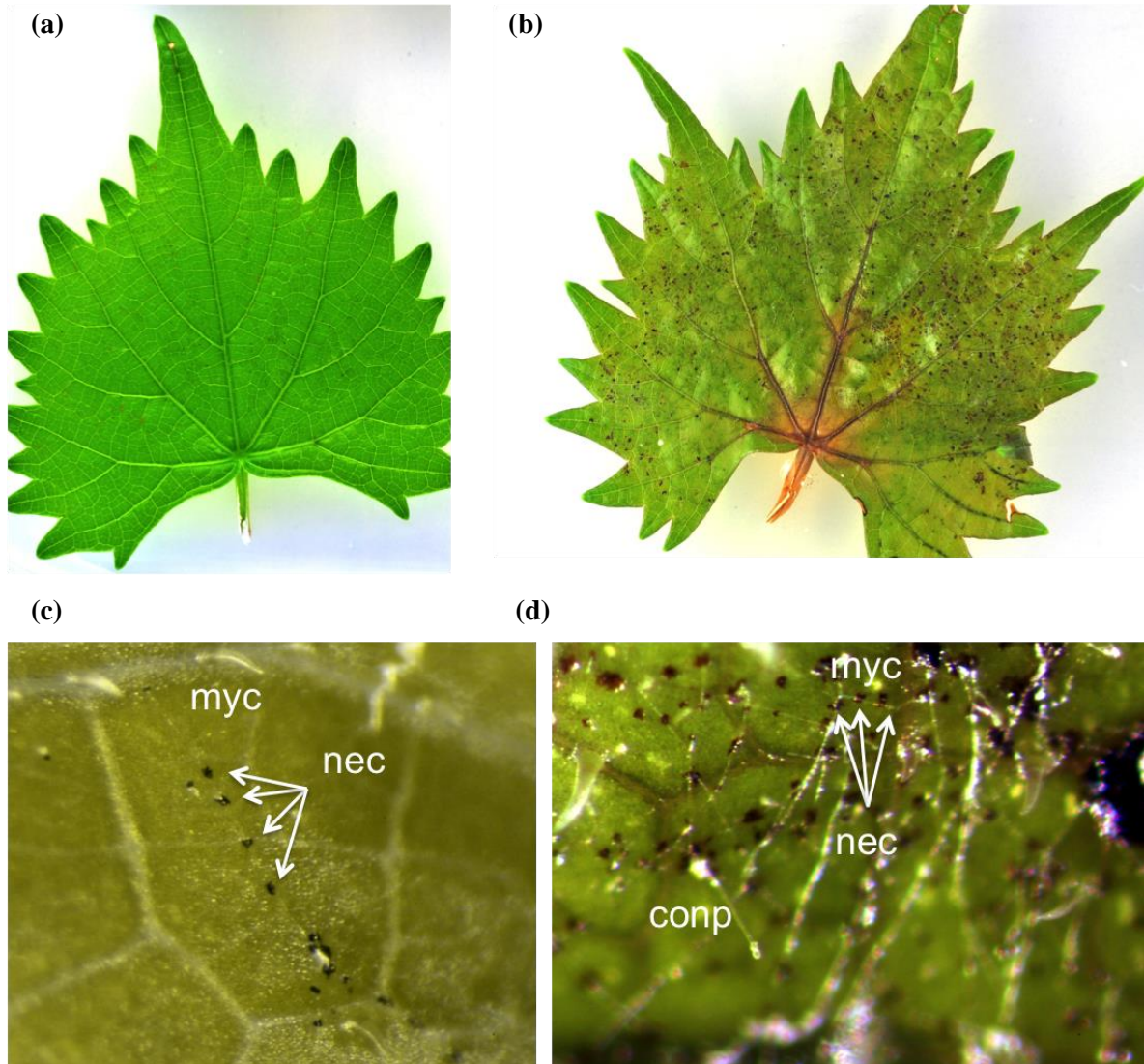
Une particularité du développement mycélien sur *M. rotundifolia* est la présence de nécroses régulièrement espacées le long du filament mycélien. Sur un témoin sensible de type 'Cinsault', aucune nécrose n'est observée sur la feuille quand l'agent pathogène se développe. Sur les feuilles de la population '42055' ainsi que sur le parent 'Regale', des points nécrotiques sont visibles, marquant le trajet du mycélium d'*E. necator*.

La figure 32 présente une illustration de ce que l'on observe sur un génotype très résistant (MYC 8) et sur un génotype sensible (MYC 5) de la population '42055', macroscopiquement et sous la loupe à fort grossissement (x50). Macroscopiquement, rien n'est visible sur le génotype MYC 8 (Figure 32a). A plus fort grossissement, on observe que seuls quelques courts filaments mycéliens parviennent à se développer (Figure 32c).

Sur le génotype MYC 5, au contraire, une myriade de points nécrotiques constelle la feuille, marquant le passage des filaments mycéliens d'oïdium (Figure 32b). A plus fort grossissement, sous la loupe, les nécroses qui parsèment le trajet du mycélium sont visibles aussi bien chez l'individu résistant que chez le plus sensible (Figures 32c et d). Les nécroses sont beaucoup plus nombreuses chez l'individu MYC 5, car davantage de mycélium parvient à se développer sur ce génotype. Des conidiophores peuvent également être observés chez les individus les plus sensibles (Exemple sur la figure 32d, un conidiophore portant 2 conidies).

### ***III.2.1. Analyse QTL***

Le test de Kruskal-Wallis a permis de mettre en évidence la présence d'un QTL majeur situé sur le GL14 contrôlant la résistance à *E. necator* dans la population '42055', pour les paramètres concernant le développement mycélien (MYC) et la sporulation (SPO) de l'agent pathogène. Pour MYC, 16 marqueurs ont obtenu le plus haut niveau de liaison statistique possible avec le logiciel MapQTL®6.0 ( $P < 0.0001$ ). Quatorze marqueurs ont été trouvés significativement liés à la résistance ( $P < 0.005$ ) pour SPO, dont 3 obtenant le plus haut niveau de liaison statistique possible : VMC9c1, Chr14V060 et UDV050 (Tableau 21).



**Figure 32.** Illustration du développement d'*E. necator* dans la population '42055', sur un génotype à MYC 8 (a et c) et sur un génotype à MYC 5 (b et d) ; a et b : photos macroscopiques ; c et d : photos réalisées sous la loupe (grossissement x50) ; myc = mycélium, nec = nécroses (indiquées par les flèches blanches) ; conp = conidiophore.

GL	Position le long du GL (cM)	Marqueur microsatellite	Niveau de probabilité significative	
			MYC	SPO
14	0,000	VMCNG1e1	*****	***
14	3,477	VVC62	*****	****
14	4,148	VVIp05	*****	*****
14	6,247	Chr14V058	*****	****
14	6,386	VMC9c1	*****	*****
14	6,422	Chr14V060	*****	*****
14	6,557	UDV050	*****	*****
14	8,598	Chr14V041	*****	****
14	8,915	Chr14V048	*****	****
14	10,196	Chr14V015	*****	****
14	10,267	Chr14V054	*****	****
14	10,267	Chr14V056	*****	****
14	10,335	VVIq32	*****	****
14	11,310	VMC1e12	*****	****
14	17,706	VMC2h12	*****	**
14	21,266	VVC34	*****	*
14	58,405	VVIIs70	-	-
14	63,847	VVIIn70	-	-

**Tableau 21.** Résultat du test de Kruskal-Wallis effectué pour les paramètres MYC et SPO, en considérant la moyenne des deux répétitions biologiques effectuées.

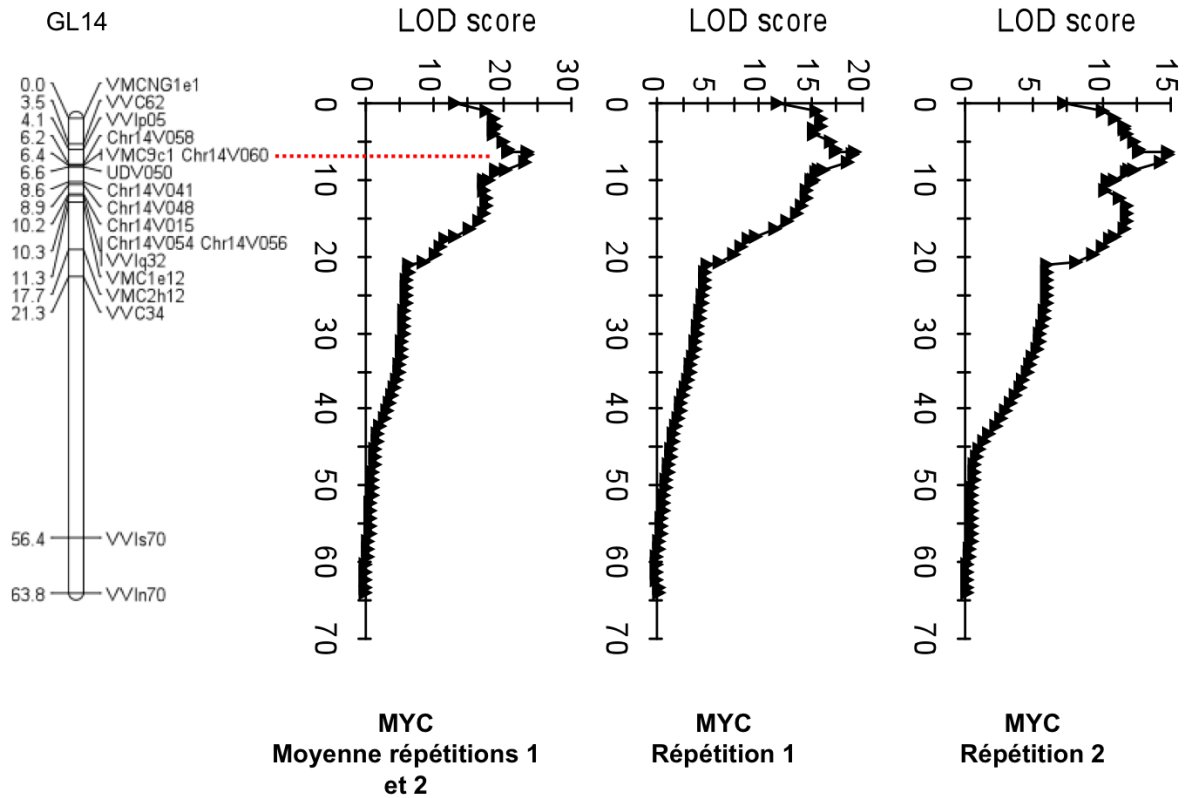
\*= $P < 0.1$  ; \*\*= $P < 0.05$  ; \*\*\*= $P < 0.01$  ; \*\*\*\*= $P < 0.005$  ; \*\*\*\*\*= $P < 0.001$  ; \*\*\*\*\*= $P < 0.0005$  ;  
 \*\*\*\*\*= $P < 0.0001$

L'analyse en cartographie d'intervalle confirme la présence de ce QTL, en ce qui concerne les deux paramètres MYC et SPO (Figure 33 ; Tableau 22). L'analyse basée sur MYC a donné le LOD score le plus élevé (23,73), expliquant 58% de la variance phénotypique totale soit près de 80% de la variance génétique, en considérant l'héritabilité au sens large estimée à 73%. La même région représente 11,4% de la variation phénotypique (LOD score 3,31) pour SPO, et donc 22% de la variance génétique, en considérant l'héritabilité estimée à 52%. L'intervalle de confiance du QTL détecté pour MYC a été localisé entre les marqueurs Chr14V058 et Chr14V041, le pic du QTL se trouvant au niveau des marqueurs SSR VMC9c1 et Chr14V060 (Figure 33 ; Tableau 22). Le locus de résistance situé à cet emplacement a été nommé 'Resistance to *Erysiphe necator* 5' (*Ren5*). La région génomique située entre les marqueurs flanquant l'intervalle de confiance de *Ren5* couvre une distance physique de 1,34 Mb et comprend environ 70 gènes, selon la version 12X de la séquence du génome de la vigne (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>).

Un QTL mineur a été détecté sur le GL20 pour le paramètre de sporulation de l'agent pathogène (LOD 2,52) très proche du marqueur VMC8d11 (Tableau 22 ; Figure 34). Ce QTL s'est maintenu au-dessus du seuil de LOD donné par l'analyse en test de permutation (2,0 pour le GL20). Les marqueurs VMC8d11 et VVSC1H069K09R1-1 ont obtenu une bonne liaison statistique au QTL de résistance ( $P < 0.001$ ).

En choisissant VMC9c1 et Chr14V060 comme co-facteurs pour une analyse en cartographie MQM (Multiple QTL mapping), le QTL spécifique à la sporulation du GL20 est resté au-dessus du seuil de LOD. De manière intéressante, un nouveau QTL mineur est apparu sur le GL5 près du marqueur VVIv21 pour les deux paramètres MYC et SPO (LOD 4,96 et 2,66), expliquant 7,8 et 8,4% de la variation phénotypique, respectivement, donc 10,7 et 16,2% de la variance génétique, en prenant en compte les héritabilités respectives des caractères (Tableau 22 ; Figure 35). Tous les QTL mis en évidence ont été détectés pour les deux répétitions biologiques prises séparément.

PARTIE B



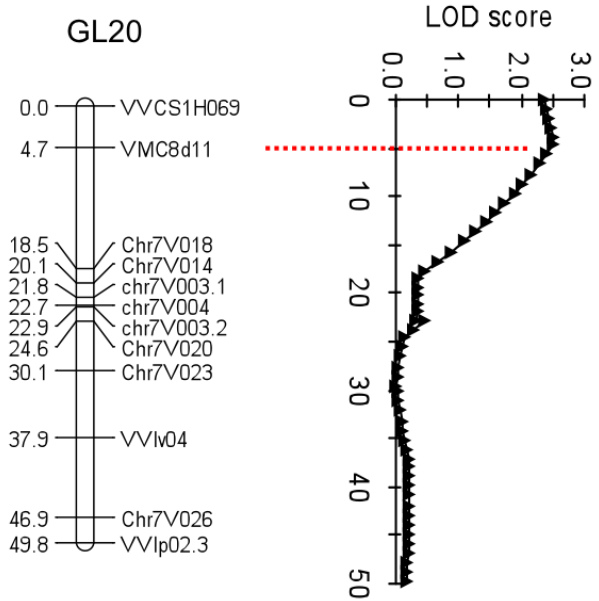
**Figure 33.** Localisation du QTL de résistance à l'oïdium sur le GL14 de *M. rotundifolia* en analyse par cartographie d'intervalle (SIM), pour le paramètre MYC. Le pic du QTL se situe au niveau des marqueurs VMC9c1 et Chr14V060. Pour les trois graphes, la courbe reste au-dessus du seuil obtenu avec les tests de permutations, fixé à 2,1 pour le GL14 avec la moyenne des répétitions (données non représentées).

Caractère	Groupe de liaison	Marqueur le plus proche	Position du pic	Intervalle LOD 2	LOD score	Pourcentage de variance phénotypique expliquée	Pourcentage de variance génétique expliquée
MYC	14	VMC9c1/ Chr14V060	6.4	6.2 - 8.6	23.73	58	79.4
MYC	5	VVIv21	31.5	21.6 - 48.9	4.96	7.8	10.7
SPO	14	VMC9c1	6.4	0 - 20.7	3.31	11.4	21.9
SPO	20	VMC8d11	0	0 - 17.7	2.52	8.8	16.9
SPO	5	VVIv21	31.5	18.0 - 49.5	2.66	8.4	16.2

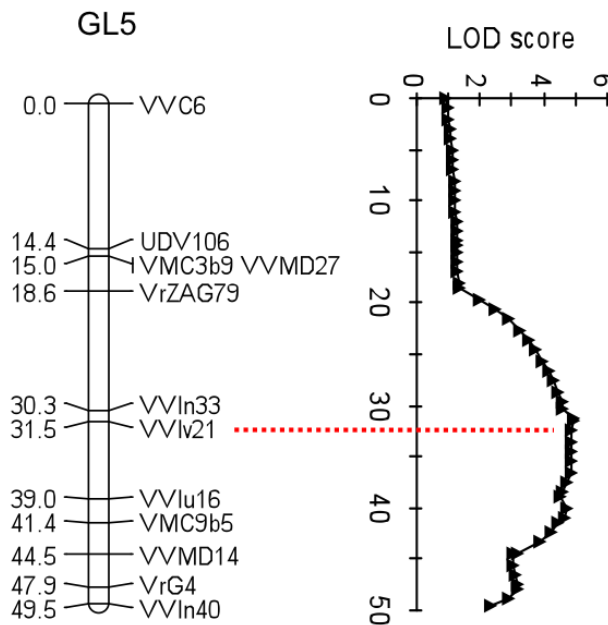
**Tableau 22.** QTL de résistance à *E. necator* détectés dans la population '42055'.

PARTIE B

Position le long du GL (cM)	Marqueur microsatellite	Niveau de probabilité significative
0,000	VVCS1H069K09	****
4,668	VMC8d11	****
18,494	Chr7V018	-
20,070	Chr7V014	-
21,800	Chr7V003.1	-
22,739	Chr7V004	-
22,864	Chr7V003.2	-
24,566	Chr7V020	-
30,142	Chr7V023	-
37,877	VVlv04	-
46,893	Chr7V026	-
49,769	VVlp02.3	-



**Figure 34.** Localisation du QTL mineur de résistance à l'oïdium du GL20 de *M. rotundifolia*. (a) Test de Kruskal et Wallis :  $*=P<0.1$  ;  $**=P<0.05$  ;  $***=P<0.01$  ;  $****=P<0.005$  ;  $*****=P<0.001$  ;  $*****=P<0.0005$  ;  $*****=P<0.0001$  ; (b) Analyse par cartographie d'intervalle (SIM). Le pic du QTL se situe au niveau du marqueur VMC8d11.

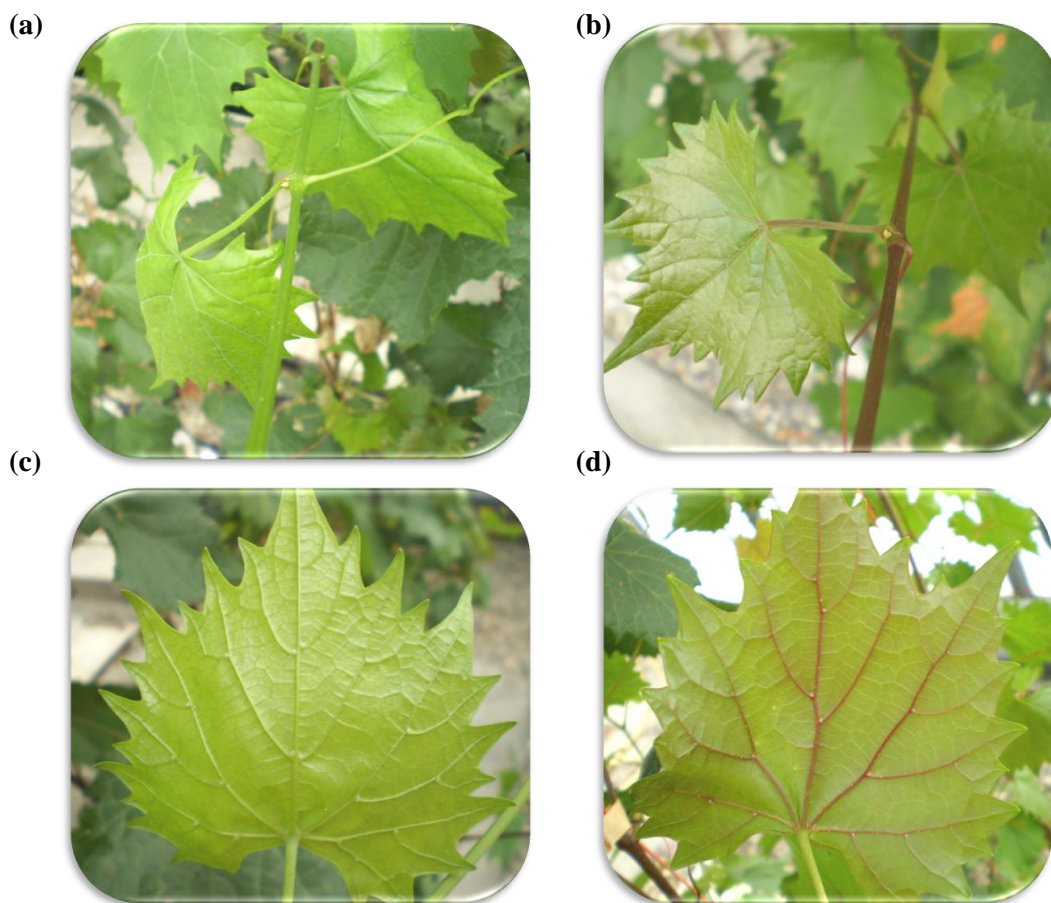


**Figure 35.** Localisation du QTL mineur de résistance à l'oïdium du GL5 de *M. rotundifolia*, en analyse MQM, pour le paramètre MYC. Le pic du QTL se situe au niveau du marqueur VVlv21.



### III.3 Analyse de la couleur des parties herbacées chez *M. rotundifolia*

En marge de l'étude de la résistance de la muscadine aux maladies cryptogamiques, l'observation de la population '42055' en serre a conduit à la mise en évidence d'une disparité dans la couleur des parties herbacées des plantes (tiges, entrenœuds, feuilles). Certains individus présentent des parties herbacées d'une couleur vert tendre uniforme aisée à identifier, les autres arborant des nuances de rouge variant en intensité selon les génotypes et en fonction de l'organe considéré (Figure 36).

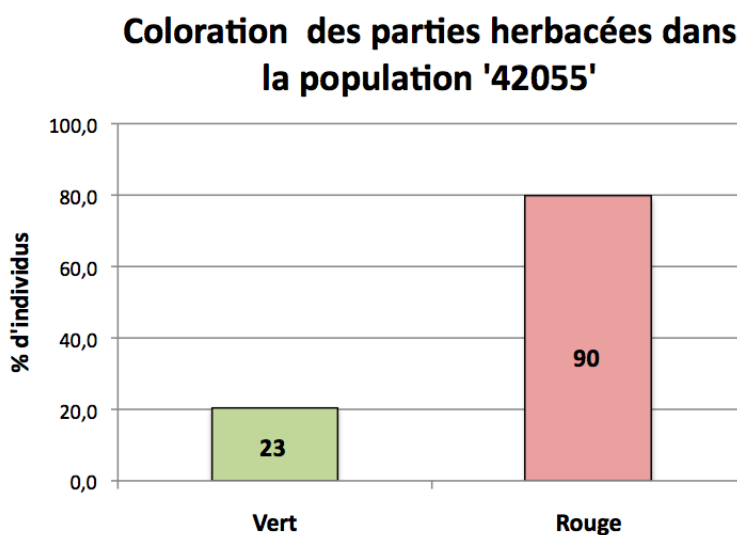


**Figure 36.** Phénotype des individus de type 'vert' (a et c) et rouge (b et d) dans la population '42055'.

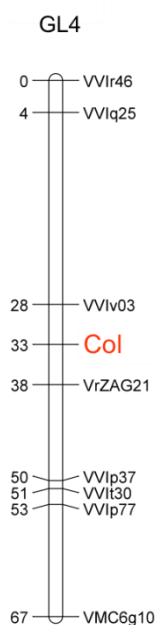
Sur les 113 plantes de la population '42055' observées pour ce phénotype, 90 ont montré un phénotype 'rouge', soit près de 80% des individus, les 23 autres arborant un phénotype 'vert' (Figures 36 et 37).

Un test de  $\chi^2$  réalisé sur ces données a montré une absence de distorsion de ségrégation du jeu de données par rapport à la ségrégation de type 3/4 : 1/4 que l'on peut s'attendre à obtenir lorsqu'un caractère qualitatif (monogénique) ségrège dans une population

(Figure 37). Ce critère phénotypique a donc été encodé comme un marqueur hétérozygote dominant pour être intégré à la carte génétique de *M. rotundifolia* et connaître ainsi la localisation du facteur génétique responsable de cette variation. Ce marqueur a été baptisé Col, et se situe au milieu du GL4 de *M. rotundifolia*, entre les marqueurs SSR VViv03 et VrZAG21 (Figure 38).



**Figure 37.** Pourcentage d'individus de phénotypes 'vert' et 'rouge' observé dans la population '42055', n = 113. Les chiffres indiquent les effectifs par catégorie.



**Figure 38.** Localisation du marqueur Col sur le GL4 de la carte génétique de *M. rotundifolia*.

## IV. Discussion

### IV.1 Résistance au mildiou

L'analyse QTL a démontré que la résistance au mildiou dérivée de *M. rotundifolia* cv. Regale était déterminée par un QTL situé sur le GL18, qui explique près de 46% de la variance génétique observée. Le QTL se situe au niveau de l'un des deux clusters majeurs de gènes R présents sur le génome de la vigne, le deuxième se situant sur le GL12. L'intervalle de confiance du QTL de résistance au mildiou chevauche celui du QTL *Rpv2* identifié à partir de *M. rotundifolia* cv. Trayshed (Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006). Cela indique que la résistance au mildiou chez les cultivars de 'Trayshed' et 'Regale' est, au moins en partie, gouvernée par la même région du GL18, même s'il est prématuré à l'heure actuelle de conclure à l'implication d'un seul et même facteur génétique.

Une faible variation phénotypique est observée dans la population '42055', les individus les plus « sensibles » montrant une résistance partielle de très haut niveau. Cela indique qu'outre la présence du QTL situé sur le GL18, 'Regale' possède vraisemblablement plusieurs autres facteurs génomiques à l'état homozygote qui lui assure un niveau de résistance basale extrêmement élevé. Malgré la faible variation des symptômes dans la population d'étude, un QTL solide a pu être détecté avec le logiciel MapQTL®6.0, ce qui démontre la puissance de l'analyse QTL.

Le paramètre OIV452, permettant d'évaluer la résistance de 'Regale' au mildiou est un critère de notation qui comprend des paramètres de nécrose et de sporulation. En analyse QTL, les critères de nécroses du disque foliaire tels que la présence ou l'absence de nécrose, la quantité de disques nécrotiques, la couleur ou la taille des nécroses n'ont donné aucun résultat significatif, avec une héritabilité au sens large nulle. En revanche le critère de sporulation (présence/absence) a conduit aux mêmes résultats que le critère OIV452, à savoir la mise en évidence du QTL du GL18 avec une héritabilité égale à 0,53. Cela signifie que le degré de résistance des individus a été évalué sur leur capacité à sporuler. Quand une sporulation a pu être observée, seulement un ou quelques sporangiophores très courts ont été visualisés à la surface d'au moins un disque foliaire. Cette variation phénotypique peut paraître mince, mais elle prouve que certains génotypes autorisent une sporulation du mildiou. Cette sporulation est le signe

d'un affaiblissement des défenses de la plante, puisque l'émission d'un sporangiophore sur la surface foliaire implique en amont le développement du mycélium de l'agent pathogène dans les tissus du mésophylle de la feuille.

#### IV.2 Résistance à l'oïdium

L'analyse des symptômes du développement d'*E. necator* sur les individus de la population '42055' montre la présence le long des filaments mycéliens de points nécrotiques régulièrement espacés caractéristiques de l'espèce. Ces nécroses locales sont retrouvées quelque soit le degré de sensibilité des individus. Il est très probable qu'elles constituent des réactions d'hypersensibilité locale (HR) générées par la plante en réaction à la présence de l'agent pathogène. Au cours du développement de son mycélium, le champignon crée régulièrement de nouvelles structures appressorium/haustorium qui assurent sa nutrition. Mais c'est également par la structure haustoriale que passent les effecteurs de résistance de la plante. Il est donc très probable que les points nécrotiques observés se forment au niveau des haustorium, ces nécroses suivant de plus parfaitement le chemin qu'emprunte le filament mycélien (Figure 32). Cette réaction de défense avec HR associée rappelle la réponse médiée par le gène *Run1*, localisé sur le GL12 de *M. rotundifolia* cv. G52 (Pauquet *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2005). Chez 'Regale', un ou plusieurs gènes de résistance fixés sont probablement responsables de ces nécroses, puisqu'elles sont observées quelque soit le génotype testé, chez les individus totalement résistants comme chez les plus sensibles de la population '42055'.

La variabilité observée dans la population '42055' pour la résistance à l'oïdium est principalement déterminée par un QTL de résistance majeur situé sur le GL14, qui explique presque 80% de la variance génétique pour le critère du développement mycélien. Ce locus a été appelé *Ren5*, pour '*Resistance to Erysiphe necator 5*'. Ce QTL influence le développement du mycélium du champignon ainsi que sur l'intensité de la sporulation. Un QTL mineur détecté sur le GL5 expliquant jusqu'à 16% de la variation génétique joue également un rôle dans la résistance à l'oïdium chez 'Regale'. Un facteur génétique spécifique à la sporulation et localisé en haut du GL20 chez la muscadine est également impliqué dans cette résistance. Les analyses QTL pour la résistance aux maladies chez la vigne révèlent souvent des QTL majeurs associés à des QTL mineurs, ce qui est un phénomène classique quand on étudie la génétique de la

résistance aux maladies chez les plantes (ex. George *et al.* 2003; Nair *et al.* 2005; Calenge *et al.* 2005).

Le fort effet de *Ren5* associé au bon niveau de couverture global de la carte génétique de *M. rotundifolia* indiquent qu'aucun facteur génétique significatif autre que ceux détectés dans cette étude ne ségrège dans la population '42055'. *Ren5* est situé dans la partie supérieure du GL14, et est flanqué par les marqueurs SSR Chr14V058 et Chr14V041, dans une région génomique jusqu'alors jamais décrite comme contrôlant une résistance à l'oïdium chez *M. rotundifolia* ou chez des espèces de *Vitis*. Jusqu'à présent, seul le gène de résistance dominant à l'oïdium *Run1* avait été identifié chez *M. rotundifolia* (Pauquet *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2005). Récemment, Riaz *et al.* (2011) ont identifié sur le GL18 chez 'Magnolia' et 'Trayshed' deux loci de résistance à l'oïdium, respectivement nommés *Run2.1* et *Run2.2*. Différentes sources de résistance ont donc été identifiées à partir de cultivars différents de *M. rotundifolia*. Il est donc utile et nécessaire d'explorer la résistance issue de différentes variétés de muscadine pour avoir une connaissance la plus exhaustive possible des facteurs de résistance intervenant chez cette espèce.

Le pedigree de 'Regale' est complexe : ce cultivar descend d'un croisement entre les cultivar 'Hunt' et 'Magnolia'. Nos résultats associés à ceux de Riaz *et al.* (2011) suggèrent que la résistance de 'Regale' à l'oïdium pourrait provenir du parent 'Hunt', puisque le facteur à l'origine de la résistance de 'Magnolia' à l'oïdium est localisé sur le GL18. 'Magnolia' est le fruit du croisement des variétés [( 'Thomas' x 'Scuppernong' ) x ( 'Topsail' x 'Tarheel' )]. Quant au pedigree de 'Hunt' il n'est pour le moment pas établi de manière certaine, mais ce cultivar semble avoir un profil microsatellite tout à fait unique (Summaira Riaz, UC Davis, USA, communication personnelle).

Le locus *Ren5* de résistance à l'oïdium chez *M. rotundifolia* est situé le long du GL14 dans l'intervalle de confiance de *Rpv8*, le QTL majeur de résistance au mildiou identifié chez l'espèce *V. amurensis* (Blasi *et al.*, 2011). La question qui en découle est de savoir si un ou plusieurs facteurs sont impliqués dans ces résistances. Le phénotypage mildiou de la population '42055' n'a pas permis d'identifier de QTL de résistance sur le GL14, mais on pourrait penser que la variation phénotypique dans la population n'était pas suffisamment grande pour mettre en évidence un ou plusieurs QTL mineurs. D'autre part, des expériences préliminaires de phénotypage oïdium sur des génotypes *Rpv8+* et *Rpv8-* de la population ayant servi à mettre en évidence le QTL *Rpv8*, n'ont pas permis

d'identifier des différences majeures de développement mycélien ni de sporulation entre les 2 types de génotypes. Cette expérience devra être répétée pour confirmer ce résultat, mais ces conclusions préliminaires semblent indiquer que le gène responsable de la résistance au mildiou chez *V. amurensis* n'intervient pas ou pas de manière significative dans la résistance partielle de l'espèce asiatique à l'oïdium. Pour le moment, l'hypothèse la plus vraisemblable est les deux QTL *Rpv8* et *Ren5* correspondent à au moins deux gènes distincts.

En se basant sur la dernière version de la séquence du génome de la vigne (12X, <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>), l'intervalle de confiance de *Ren5*, autrement dit la région délimitée par les marqueurs Chr14V058 et Chr14V041 représente environ 1,34 Mb et contient quelques 70 gènes prédits, ce qui ne permet pas de spéculer sur un candidat pour la fonction de *Ren5*. Néanmoins, l'inspection de cette région sur la version 12X de la séquence du génome de la vigne révèle la présence d'au moins six gènes de type NBS-LRR ainsi que du gène de *V. vinifera* EDR1, un régulateur des réponses de défense (Frye *et al.*, 2001). Il n'est donc pas à écarter que *Ren5* soit un membre de la classe des gènes de résistance aux maladies NBS-LRR.

D'autre part, un QTL mineur spécifique de la sporulation a été détecté au niveau de l'extrémité supérieure du GL20 de *M. rotundifolia*. L'inspection de la zone correspondant au pic du QTL sur la version 12X de la séquence du génome de la vigne indique que cette région chromosomique correspond à un cluster de gènes R s'étendant sur 150kb. Ce cluster comprend plusieurs gènes codant pour des protéines putatives de type CC-NBS-LRR. Ce résultat est doublement intéressant, car la zone portant le QTL mineur du GL20 est par son emplacement même une zone propice aux réarrangements chromosomiques et qui est le siège d'une forte activité de recombinaison (voir Partie A). Or il a été montré chez les *Solanaceae* notamment, qu'il existait une relation entre clusters de gènes R et réarrangements chromosomiques. Le point de cassure de la translocation qui différencie le chromosome 9 du poivron, le chromosome XII de la pomme de terre, et le chromosome 12 de la tomate, tous trois synténiques, se trouve apparemment dans ou à proximité d'un cluster de gènes R (Livingstone *et al.*, 1999; Grube *et al.*, 2000). Une seconde étude de cartographie comparative chez les *Solanaceae* a récemment montré que chaque point de cassure à l'origine d'un réarrangement chromosomique était associé à un ou plusieurs gènes R ou résistances cartographiées (Mazourek *et al.*, 2009). Chez les *Vitaceae*, outre le QTL de résistance

déecté dans la partie supérieure du GL20 de *M. rotundifolia*, il est intéressant de noter que *Ren5* se situe dans la partie supérieure du GL14. Ce GL est divisé en deux couleurs sur la représentation des régions paralogues de *V. vinifera* dérivées de trois génomes ancestraux (Jaillon *et al.*, 2007 ; Figure 20), à l'instar du GL7. Le GL14 pourrait donc également comporter un point de cassure chromosomique ancestral. Il est pour le moment prématuré d'avancer davantage dans les conclusions que l'on peut déduire de ces informations, mais l'acquisition de données de séquence chez la muscadine permettrait d'expliquer précisément la relation entre les clusters de gènes de résistance et les points de cassure chromosomiques entre les genres de *Vitaceae*.

#### **IV.2 Couleur des parties herbacées**

Chez de nombreuses plantes dont la vigne, la pigmentation des fruits comme des parties herbacées est déterminée par l'accumulation de pigments rouges appelés anthocyanes. Des analyses de la ségrégation de la couleur des baies dans des populations de cartographie chez *V. vinifera* ont conduit à l'identification d'un locus génomique responsable de la présence ou de l'absence de couleur rouge sur les pellicules des baies (Doligez *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2004). Ce locus est situé sur le GL2 de *V. vinifera* (Adam-Blondon *et al.*, 2004). L'étude de Kobayashi *et al.* (2004) a établi que *VvmybA1*, un régulateur transcriptionnel de la biosynthèse des anthocyanes, était un déterminant majeur de la couleur de la baie chez la vigne. Le phénotype blanc est lié à la présence à l'état homozygote d'un élément transposable, *Gret1*, dans le promoteur du locus *VvMybA1* (Kobayashi *et al.*, 2002, 2004; Lijavetzky *et al.*, 2006; This *et al.*, 2007).

Le locus identifié dans ce travail comme responsable de la détermination de la couleur des parties herbacées (différence entre phénotypes 'vert' et 'rouge') chez *M. rotundifolia* est situé sur le GL4, soit un GL différent de celui identifié comme étant responsable de la couleur des baies chez la vigne cultivée. Mais si il a été aisé de cartographier ce locus puisqu'il ségrège comme un facteur qualitatif, il semble que les variations d'intensité et de localisation des colorations rouge observées dans les tissus herbacés de la population '42055' soient d'ordre quantitatif. Il serait intéressant de réaliser des notations plus précises pour ce paramètre, de quantifier l'intensité de la couleur rouge dans différents tissus comme la tige et les feuilles par exemple, et de réaliser une analyse QTL pour déterminer les régions génomiques à l'origine de ces variations.

Pour le moment, aucune donnée ne permet de confirmer que le déterminisme de la couleur des baies est le même chez *V. vinifera* et chez *M. rotundifolia*. Les fruits de 'Regale' sont de couleur noire (Figure 39), mais aucune observation n'a pu être réalisée sur la couleur des baies au sein de la population '42055', car les plantes n'ont pas donné de fruits. On peut également émettre l'hypothèse que les colorations des fruits et des parties herbacées chez la vigne n'impliquent pas les mêmes facteurs génétiques. Des observations réalisées sur des S1 de Pinots et de Gewurztraminer à l'INRA de Colmar indiquent que la ségrégation des anthocyanes dans les parties herbacées des plantes semble être indépendante de celle de la couleur de la pellicule des baies (Vincent Dumas, INRA, Colmar, communication personnelle).

En ce qui concerne la muscadine, Goldy *et al.* (1987) ont évalué le contenu de fruits et de tissus herbacés de *M. rotundifolia* cv. Noble vis à vis de la présence de cinq pigments anthocyaniques principaux chez la muscadine. Les corrélations entre les contenus de ces pigments dans le fruit d'une part, et dans les tiges, les pétioles, les vrilles et les feuilles d'autre part ont montré des niveaux très variables en fonction du pigment et du tissu considéré (Goldy *et al.*, 1987).

Les résultats que nous avons obtenus vont dans le sens de ces observations, à savoir que différents facteurs génétiques interviennent probablement chez la muscadine dans la coloration des tissus herbacés et des fruits. Il serait intéressant d'évaluer la couleur des baies dans la population '42055' pour pouvoir confirmer cette hypothèse.



**Figure 39.** Grappe de fruits portée par un pied de *M. rotundifolia* cv. Regale (Source : photothèque INRA Colmar).



## V. Conclusion

Une recherche de QTL a été réalisée sur la population '42055', en intégrant les données de cartographie génétique et les données phénotypiques de résistance au mildiou et à l'oïdium. Cette étude a permis la mise en évidence chez *M. rotundifolia* cv. Regale d'un QTL de résistance au mildiou sur le GL18, dont l'intervalle de confiance coïncide avec celui du QTL *Rpv2* mis en évidence chez le cultivar 'Trayshed' (Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006). Un QTL majeur de résistance à l'oïdium situé sur le GL14 a également été identifié, et baptisé *Ren5*. Ce QTL est situé dans une région génomique qui n'avait jusqu'à présent jamais été identifiée comme contrôlant une résistance à l'oïdium chez la vigne. *Ren5* explique chez 'Regale' jusqu'à 58% de la variance phénotypique totale pour le critère du développement mycélien du champignon, soit près de 80% de la variance génétique en considérant l'héritabilité estimée à 73% du caractère, et confère une résistance totale à l'espèce contre *E. necator*.

La troisième partie de ce mémoire sera consacrée à une analyse plus détaillée de ce QTL de résistance majeur à l'oïdium. L'effet de *Ren5* au niveau microscopique, dans les phases précoces de l'infection, ainsi que son comportement vis à vis d'autres souches d'oïdium, seront présentés.

PARTIE C :  
ETUDE DE L'EFFET ET DU  
SPECTRE D'ACTION DU QTL  
*REN5*



## **PARTIE C : ETUDE DE L'EFFET ET DU SPECTRE D'ACTION DU QTL *REN5***

### **I. Introduction**

Le chapitre précédent de ce manuscrit présentait la mise en évidence d'un QTL majeur de résistance à l'oïdium chez *M. rotundifolia* cv. Regale, qui a été nommé *Ren5*. Ce QTL, situé sur le GL14 de *M. rotundifolia*, explique près de 80% de la variance génétique pour le critère du développement mycélien du champignon et apporte une résistance totale à la plante.

Cette dernière partie présente une analyse plus détaillée de l'effet du QTL *Ren5* chez 'Regale'. Tout d'abord, une analyse de l'effet de *Ren5* au niveau microscopique a été réalisée, en utilisant la souche Chlo2b qui a servi à identifier le QTL, par l'observation d'images obtenues en microscopie électronique à balayage pendant les phases précoces d'infection de l'agent pathogène. Cette souche appartient au groupe B d'*E. necator*. Si *Ren5* est efficace face à Chlo2b, une question essentielle qui se pose alors est la suivante : *Ren5* est-il efficace face à d'autres souches d'oïdium ? Préalablement à une utilisation potentielle de *Ren5* en sélection, dans le cadre de la création de variétés de vigne à résistance durable, il est nécessaire d'acquérir des données sur le spectre d'action de *Ren5*, c'est-à-dire de savoir comment se comporte le QTL face à d'autres souches d'*E. necator*. Un QTL efficace contre plusieurs types de souches n'assurera pas obligatoirement à la variété une résistance durable dans le temps, car d'autres facteurs interviennent dans le phénomène de contournement d'une résistance, mais à l'inverse il serait risqué d'inclure dans un programme de sélection un QTL déjà contourné ou inefficace contre une ou plusieurs souches de l'agent pathogène. *Ren5* a donc été confronté à deux souches supplémentaires d'oïdium, appartenant aux deux groupes A et B que l'on retrouve en Europe, afin d'analyser son efficacité une fois exposé à d'autres souches que Chlo2b.

## II. Matériel et méthodes

### II.1 Etude de l'effet de *Ren5* au niveau microscopique

Les expériences de microscopie ont été réalisées à la Plateforme de Microscopie et d'Imagerie de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) de Strasbourg. Un microscope électronique à balayage de table Hitachi TM1000 a été employé, avec une tension d'accélération de 15kV, et un détecteur électronique à rétrodiffusion.

Les échantillons correspondent à des disques de 1cm de diamètre, produits à l'aide d'un emporte-pièces à partir de feuilles de vigne inoculées à Colmar avec la souche Chlo2b d'*E. necator* (voir Partie B, chapitre II.2.1). Des individus *Ren5/Ren5* (homozygotes pour l'allèle associé à la résistance au marqueur le plus proche du pic du QTL, MYC 8-9) et *ren5/ren5* (homozygotes pour l'autre forme allélique, MYC 4-6) de la population '42055' ont été choisis pour les expérimentations en microscopie électronique à balayage. Les individus *Ren5/Ren5* ont été nommés *Ren5+*, et les *ren5/ren5* ont été nommés *Ren5-*.

Trois génotypes ont été analysés par niveau de résistance : 2420M, 2474M et 2487M, pour les *Ren5+*, et 2407M, 2476M et 2484M pour les *Ren5-*. Les observations ont été effectuées à 3 hpi (heures post-inoculation), 4 hpi, 1 jpi (jour post-inoculation) et 2 jpi. Deux répétitions biologiques ont été effectuées en 2011 et 2012.

### II.2 Etude du spectre d'action de *Ren5*

Les expériences ont été réalisées avec les souches d'*E. necator* B1 (biotype B) et A3 (biotype A). La souche B1 a été récoltée sur *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon à la Grande Ferrade (Bordeaux, France) en 2009. La souche A3 a été récoltée sur *V. vinifera* cv. Carignan à Tresserre (Pyrénées-Orientales, France) en 2009. Les souches ont d'abord été entretenues à l'INRA de Bordeaux (Marie-France Corio-Costet), puis envoyées à l'INRA de Colmar en 2012. L'entretien des souches à Colmar a été réalisé sur jeunes feuilles détachées provenant de boutures en vert de *V. vinifera* cv. Muscat Ottonel ou Cinsault (voir Partie B, chapitre II.2.1). La réalisation du phénotypage s'est déroulée comme décrit dans la Partie B, chapitre II.2.2, b.

Quatre génotypes *Ren5+*, 2401M, 2420M, 2481M et 2544M, et trois génotypes *Ren5-*, 2407M, 2476M et 2484M, ont été inoculés avec les souches A3 et B1 par la tour d'inoculation, à raison de deux feuilles vernissées par génotype, chaque tour contenant un témoin sensible (*V. vinifera* cv. Cinsault) et un témoin résistant (*M. rotundifolia* cv.

Regale). Les notations ont été réalisées à 7 jpi sur les deux paramètres du développement mycélien (MYC) et de la sporulation (SPO) du champignon.

Deux répétitions biologiques indépendantes ont été effectuées par souche en 2012.

La souche Chlo2b a souffert d'une contamination au moment où ces expérimentations ont été réalisées, et n'a donc pas pu être incluse dans cette série d'expériences. La moyenne des deux répétitions effectuées en 2012 avec les souches A3 et B1, et la moyenne des deux répétitions effectuées en 2010 et 2011 avec Chlo2b, ont été comparées pour chaque paramètre. L'analyse de variance a été effectuée à l'aide du logiciel R© (R Development Core Team, 2005).

### III. Résultats

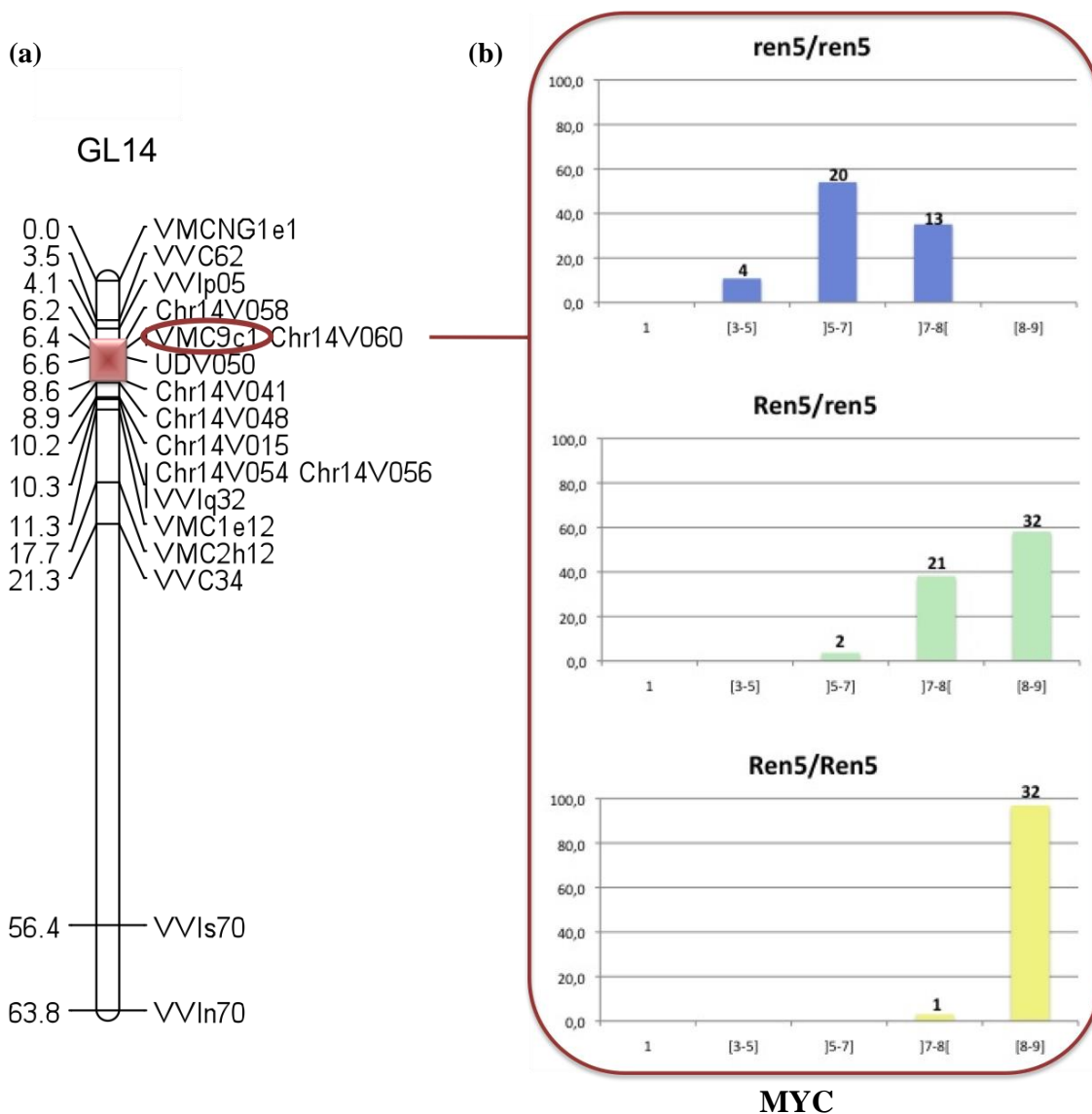
#### III.1 Etude l'effet de *Ren5* sur le développement d'*E. necator*

##### III.1.1 Distribution des données phénotypiques au locus *Ren5*

Sur le GL14 de *M. rotundifolia*, VMC9c1 et Chr14V060 sont les deux marqueurs les plus proches du pic du QTL *Ren5*. Ils ne sont pas séparables génétiquement sur la carte de *M. rotundifolia* (Figures 40 et 41), et montrent une ségrégation identique de l'allèle de résistance à l'oïdium dans la population '42055'. VMC9c1 a été choisi arbitrairement parmi ces deux marqueurs pour la suite des analyses comme étant représentatif de la ségrégation génétique de l'allèle de résistance au QTL. A ce locus, la forme allélique 132 est associée à la résistance, tandis que la forme allélique 146 est associée à la sensibilité. Les individus homozygotes 132/132 au marqueur VMC9c1 ont été nommés *Ren5/Ren5*, les individus hétérozygotes 132/146 *Ren5/ren5* et les individus homozygotes 146/146 *ren5/ren5*.

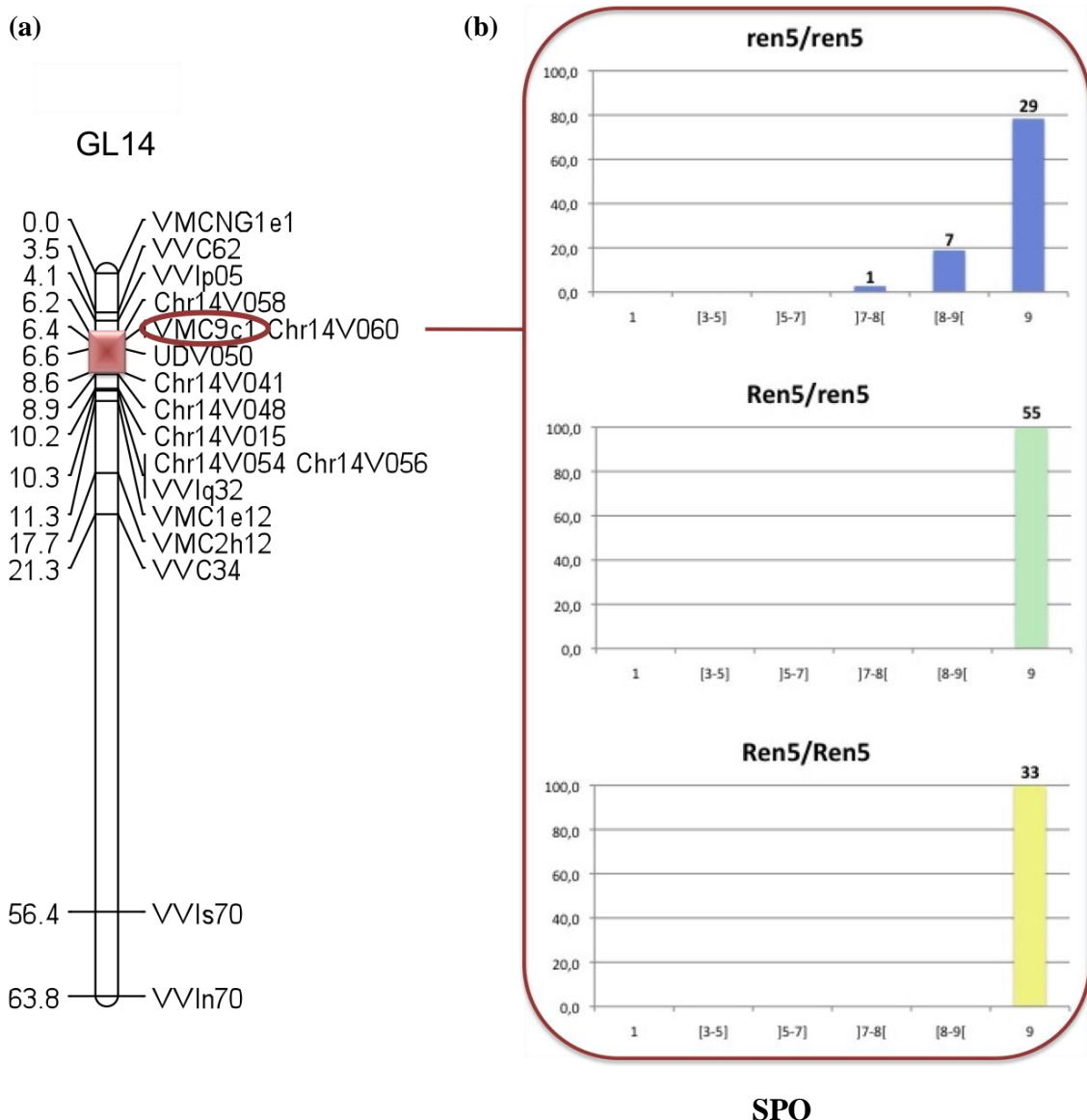
Sur la base de l'observation du développement mycélien (MYC), plus de 50% des individus *ren5/ren5* (20 sur 37) ont obtenu des notations comprises entre 5 et 7, les plus sensibles allant jusqu'à 3,5 en moyenne pour les deux répétitions biologiques effectuées, et les plus résistants restant strictement en-dessous de 8 (Figure 40). Tous les individus *Ren5/Ren5* ont obtenu des notations strictement supérieures à 7, avec 97% des individus (32 sur 33) ayant des notes supérieures ou égales à 8 sur l'échelle de résistance en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques (Figure 40). Un seul individu *Ren5/Ren5* a obtenu une notation moyenne de 7,75. Les hétérozygotes *Ren5/ren5* ont quant à eux montré une distribution des notations qui apparait intermédiaire entre les deux autres classes. Si l'on cumule les deux classes de

résistance les plus élevées, plus de 96% d'individus hétérozygotes (53 sur 55), ont néanmoins obtenu des notes strictement supérieures à 7, ce qui indique une résistance partielle de très haut niveau chez les individus hétérozygotes (Figure 40).



**Figure 40.** Distribution en pourcentages de la résistance à l'oïdium des individus de la population '42055', pour le développement mycélien (moyenne des deux répétitions biologiques) sur la base de leur génotype au locus *Ren5*. (a) GL14 de *M. rotundifolia* et intervalle de confiance de *Ren5* (rectangle rouge), le marqueur VMC9c1 étant le plus fortement associé à *Ren5*. (b) Pourcentage d'individus par classe de résistance ; Bleu : génotypes homozygotes *ren5/ren5* (forme 146/146 de VMC9c1) ; vert : génotypes hétérozygotes *Ren5/ren5* (forme 132/146 de VMC9c1) ; jaune : génotypes homozygotes *Ren5/Ren5* (forme 132/132 de VMC9c1). Les chiffres situés au-dessus des barres des histogrammes indiquent les effectifs par classe.

En ce qui concerne la sporulation du champignon (SPO), les résultats sont très homogènes pour ce qui est des génotypes hétérozygotes et *Ren5/Ren5* : 100% des individus ont obtenu des notes égales à 9, c'est-à-dire qu'aucune sporulation n'a jamais été détectée sur ces échantillons (Figure 41). Chez les individus *ren5/ren5*, en revanche, 78,4% des individus (29 sur 37) n'ont jamais sporulé, mais 21,6% d'entre eux (8 sur 37) ont réussi à émettre des conidiophores (Figure 41). Néanmoins quand une sporulation est observée, elle reste faible, puisque les notations sont toujours strictement supérieures à 7 en moyenne.

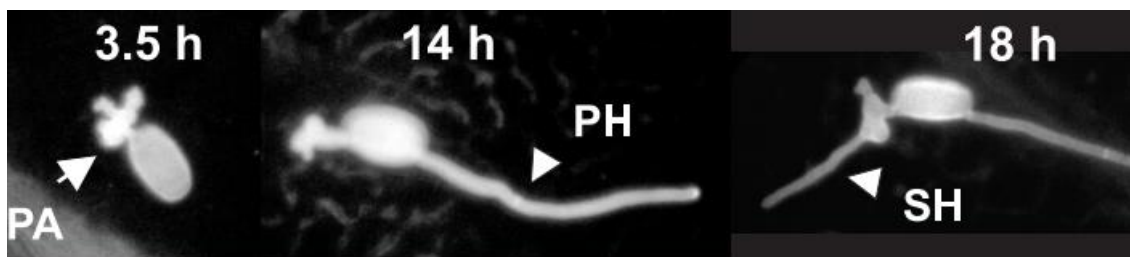


**Figure 41.** Distribution de la résistance à l'oidium des individus de la population '42055' pour la sporulation du champignon (moyenne des deux répétitions biologiques) sur la base de leur génotype au locus *Ren5*. Légende détaillée : voir Figure 40.



### III.1.1 Analyse de l'effet de *Ren5* au niveau microscopique

Les stades de développement précoce de l'oïdium ont été définis selon Rumbolz *et al.* (2000) (Figure 42). Trois stades majeurs de développement sont étudiés : le stade appressorium primaire, le stade hyphe primaire et le stade hyphe secondaire. Sur un individu sensible à l'oïdium de type *V. vinifera*, l'appressorium primaire se forme dès 3,5h après inoculation. L'hyphe primaire se développe dès 14h après inoculation, et l'hyphe secondaire 18h après inoculation.

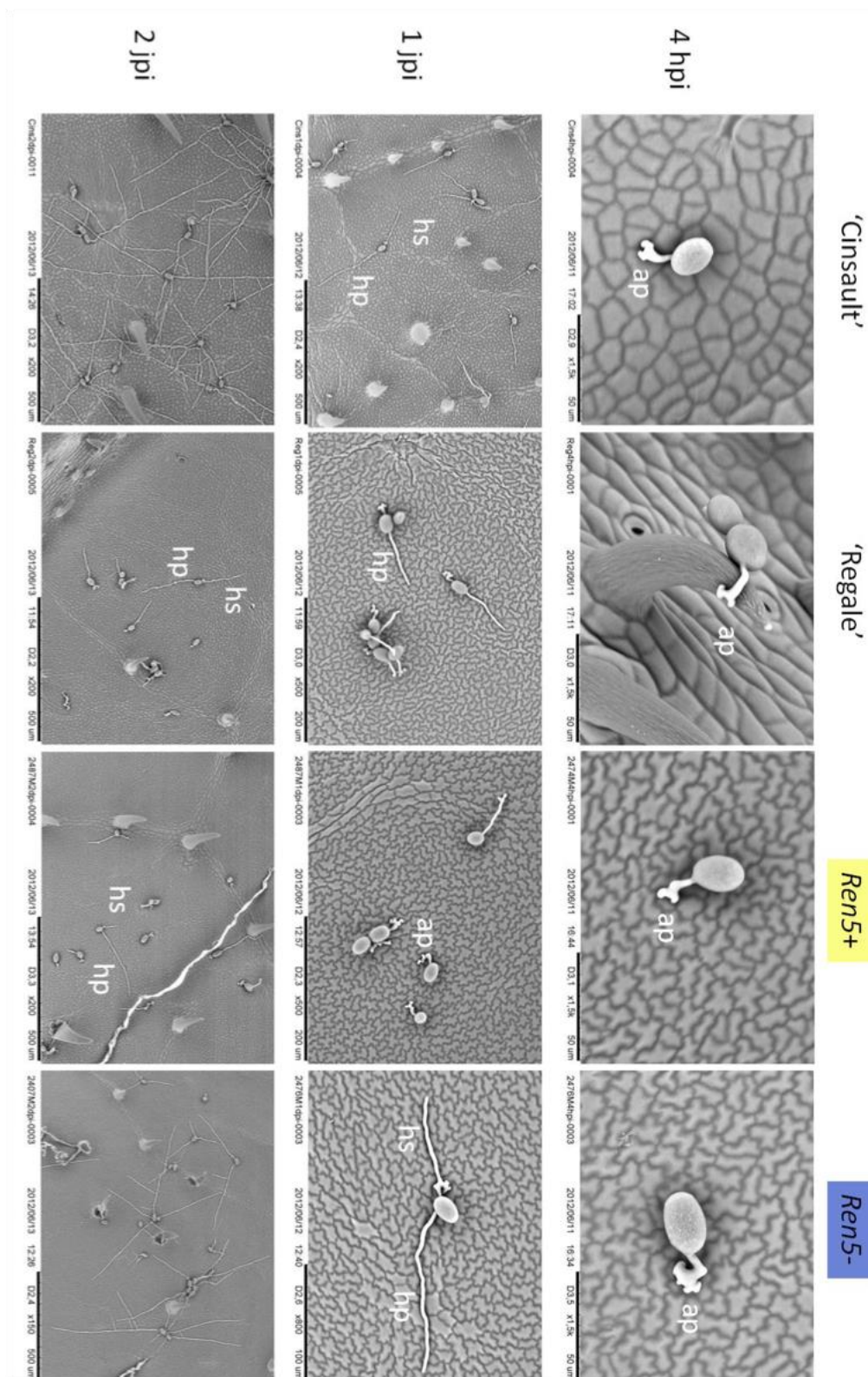


**Figure 42.** Différentiation des structures d'infection d'*E. necator*, durant la phase de développement précoce du champignon sur *V. vinifera* cv. Müller-Thurgau (Rumbolz *et al.*, 2000). Les temps indiquent la première apparition du stade après inoculation. PA=primary appressorium (appressorium primaire) ; PH=primary hyphae (hyphe primaire) ; SH=secondary hyphae (hyphe secondaire).

Le développement du champignon a été observé durant les phases précoces de l'infection sur des génotypes *Ren5*<sup>+</sup> et *Ren5*<sup>-</sup>, en utilisant le génotype 'Cinsault' comme témoin sensible et le parent 'Regale' de la population '42055' comme témoin résistant.

A 4 hpi, le témoin 'Cinsault' forme des structures appressoriales primaires. A 1 jpi, le stade majoritairement observé est le stade hyphe secondaire, ce qui est en cohérence avec le développement normal de l'oïdium sur un génotype sensible de type *V. vinifera*. Les hyphes secondaires sont généralement de taille assez courte. A 2 jpi, le témoin 'Cinsault' présente un mycélium ramifié relativement dense (Figure 43).

Le témoin 'Regale' permet également le développement du premier appressorium à partir des conidies germées à 4 hpi. A 1 jpi, les stades prédominants sont les stades appressorium primaire et hyphe primaire. Dans de très rares cas un hyphe secondaire très court peut être observé. A 2 jpi, l'oïdium sur 'Regale' se développe majoritairement jusqu'au stade hyphe primaire, certaines conidies portant de temps à autre un hyphe secondaire, plus fréquemment qu'à 1 jpi (Figure 43).



**Figure 43.** Images en microscopie électronique à balayage de génotypes *Ren5+* (132/132 au locus VMC9c1) et *Ren5-* (146/146 au locus VMC9c1), inoculés avec *E. necator* souche Chlo2b, à 4 hpi, 1 jpi et 2 jpi. Appressorium primaire : ap ; Hyphe primaire : hp ; Hyphe secondaire : hs. *V. vinifera* cv. Cinsault a été utilisé comme témoin sensible, et *M. rotundifolia* cv. Regale, parent de la population '42055', comme témoin résistant.

Concernant le développement mycélien précoce d'*E. necator* sur les génotypes *Ren5+* et *Ren5-*, les deux classes de génotypes permettent le développement d'appressorium primaires à 4 hpi, à l'instar des témoins 'Cinsault' et 'Regale' (Figure 43). A ce stade, tous les génotypes permettent donc la formation de ces structures, quelque soit le degré de résistance des individus vis-à-vis de l'agent pathogène. La présence de la structure appressoriale induit la formation consécutive d'un haustorium dans les tissus de la plante, structure qui marque le premier stade de la phase biotique du champignon.

A 1 jpi, l'oïdium se développe majoritairement au stade hyphe secondaire court sur les génotypes *Ren5-*. Les individus *Ren5+*, quant à eux, sont très majoritairement bloqués au stade premier appressorium, et dans de rares cas un hyphe primaire très court est observé (Figure 43). Dès les premières 24h de développement du champignon, des différences dans les vitesses de développement du mycélium sont donc déjà visibles entre les génotypes *Ren5+* et *Ren5-*. D'autre part, 24 heures après l'inoculation, l'oïdium est présent aux mêmes stades sur les individus qui ne portent pas le QTL de résistance et sur le témoin 'Cinsault'.

A 2 jpi, les génotypes *Ren5-* autorisent la croissance d'un mycélium ramifié (Figure 43). Sur les individus *Ren5+*, le mycélium est principalement présent au stade hyphe primaire, même si le développement d'un hyphe secondaire n'est pas rare. La présence du QTL *Ren5* dans cette expérience permet donc au maximum la formation d'hyphes secondaire courts, empêchant le mycélium de former des ramifications. La différence de vitesse de croissance du mycélium fongique est par conséquent plus marquée encore à 2 jpi qu'à 1 jpi entre les deux types de génotypes. D'autre part, s'il était difficile de différencier les individus *Ren5-* des témoins sensibles à 1 jpi, la différence entre les deux génotypes est visible à 2 jpi : le témoin 'Cinsault' présente un mycélium ramifié relativement dense, tandis que les génotypes *Ren5-* montrent un mycélium ramifié nettement moins dense (Figure 43).

Il est nécessaire de préciser qu'à chaque stade, chaque génotype montre systématiquement un mélange de conidies à différents degré d'évolution : à un même stade (1 jpi par exemple), pour un même génotype, peuvent être présentes des conidies associées à du mycélium, ou juste un appressorium, tandis que d'autres n'auront pas germé du tout. Les images de la figure 43 sont représentatives de ce que l'on observe en majorité pour chaque classe de génotypes à chaque stade.

### III.2 Analyse de l'effet de *Ren5* face à d'autres souches d'oïdium

La fiabilité de l'évaluation de la résistance à l'oïdium des individus *Ren5+* et *Ren5-* a été évaluée en notant les paramètres de résistance MYC et SPO dans les plantes témoin 'Cinsault' (sensibles), et 'Regale' (le parent totalement résistant de la population de cartographie '42055'). Toutes les plantes contrôle se sont comportées comme attendu concernant les deux paramètres de résistance évalués dans ce travail (Tableau 23).

	MYC			SPO		
	Chlo2b	A3	B1	Chlo2b	A3	B1
Cinsault	1,9±0.5	1,0±0.0	1,0±0.0	2,8±0.9	3,0±0.0	3,0±0.0
<i>M. rotundifolia</i> cv. Regale	8,2±0.1	8,0±0.1	8,0±0.1	9,0±0.0	9,0±0.0	9,0±0.0

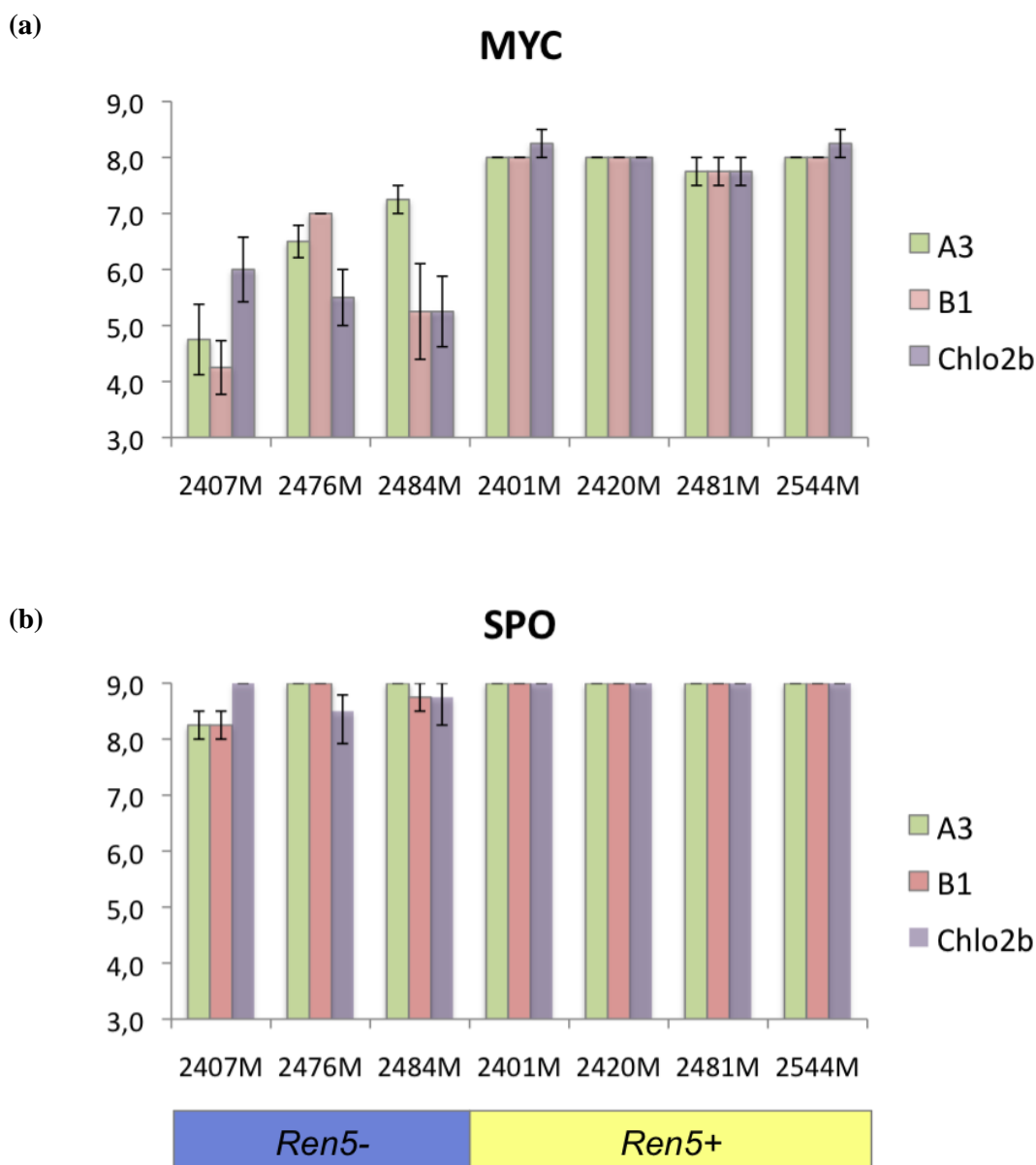
**Tableau 23.** Valeurs moyennes et intervalles de confiance des critères MYC et SPO chez les contrôles et le parent de la population pour la résistance à l'oïdium, en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques (Chlo2b : 'Cinsault', n=18 ; 'Regale', n=29 ; A3 et B1 : 'Cinsault', n=2 ; 'Regale', n=2).

Pour le paramètre du développement mycélien (MYC), comme pour celui de la sporulation (SPO), les génotypes *Ren5+* se comportent significativement de la même manière quelque soit le type de souche utilisé pour l'inoculation : les quatre individus *Ren5+* testés montrent un niveau de résistance vis à vis des souches A3 et B1 identique à celui observé vis à vis de la souche Chlo2b utilisée pour la détection du QTL *Ren5*. Les notations MYC sont toujours supérieures ou égales à 8, et la sporulation systématiquement inexistante (notation SPO égale à 9) chez les individus qui possèdent le QTL (Figure 44). La résistance apportée par *Ren5* semble donc efficace et aussi intense vis à vis des souches A3 et B1, à l'instar des résultats obtenus avec la souche Chlo2b.

Les génotypes *Ren5-* montrent quant à eux des niveaux de résistance partielle variables en intensité. Les notations MYC sont comprises entre 4,75 et 7,25 pour la souche A3, 4,25 et 7 pour la souche B1, et 5,25 et 6 pour la souche Chlo2b (Figure 44).

La présence d'une sporulation chez les individus *Ren5-* varie elle aussi selon les génotypes et selon les souches. On peut cependant remarquer que la sporulation se produit sur des génotypes ayant déjà des notations MYC en moyenne inférieures à 5 ou 6 (Figure 44).

Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée sur les génotypes *Ren5-* pour les deux paramètres évalués. Elle a révélé la présence d'une interaction significative entre le facteur souche et le facteur génotype, pour MYC ( $F=4,2353$  ;  $p=0,008657$ ) comme pour SPO ( $F=3,8438$  ;  $p=0,01343$ ). Cela signifie que l'on ne peut pas interpréter l'effet des variables prises séparément avec ce jeu de données.



**Figure 44.** Niveau de résistance à l'oidium à 7 jpi d'individus *Ren5+* et *Ren5-* de la population '42055' pour (a) le développement mycélien MYC (b) le niveau de sporulation SPO, en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques effectuées (barres noires : erreurs standard).

## IV. Discussion

### IV.1 Mode d'action de *Ren5*

Une analyse de la distribution de la résistance à l'oïdium des individus de la population '42055' a été réalisée sur la base de leurs génotypes au marqueur le plus proche du QTL *Ren5*. Pour le paramètre de développement mycélien, des individus possédant le même génotype au locus *Ren5* peuvent être répartis dans plusieurs classes de résistance, montrant ainsi des niveaux de résistance sensiblement différents. Les individus *ren5/ren5* ont ainsi des notations MYC allant de 3,5 à 7,75 ; les individus *Ren5/ren5* des notations allant de 6,75 à 9 ; et les individus *Ren5/Ren5* des notations allant de 7,75 à 9. Ces variabilités intra-classes, observées au sein d'une catégorie de génotypes au locus *Ren5* (Figures 40b et 41b), peuvent être expliquées par la présence de facteurs mineurs qui interviennent pour moduler la résistance. La variation quantitative des niveaux de résistance au sein d'un même type de génotype pourrait également être due à la présence d'individus recombinants entre le marqueur VMC9c1 et le facteur génétique responsable de la variation phénotypique au QTL *Ren5*. Cependant en considérant la précision de la carte et de l'intervalle de confiance du QTL, il semble peu probable que la présence de recombinants suffise à expliquer cette variation. Les variations intra-classes sont plus flagrantes chez les *Ren5/ren5* et les *ren5/ren5*, car la présence du QTL sous forme homozygote dominante masque l'effet des facteurs de résistance mineurs.

Par ailleurs, en l'absence totale de *Ren5*, un bon niveau de résistance basale est observé, les individus les plus sensibles de la population '42055' présentant un niveau de résistance partielle à l'oïdium. Des facteurs fixés, c'est-à-dire présents à l'état homozygote dans le génome de 'Regale', interviennent probablement et font en sorte qu'un individu 'sensible' de la population '42055' ne le sera jamais autant qu'un individu totalement sensible de type 'Cinsault', comme le montrent les observations macroscopiques et microscopiques réalisées dans ce travail.

En outre, le phénotype des individus hétérozygotes de la population '42055' semble intermédiaire entre les phénotypes des deux homozygotes. La présence des deux formes alléliques de résistance au QTL chez les individus *Ren5/Ren5* apporte une résistance totale ou quasi-totale à l'oïdium. La présence d'une seule forme allélique de résistance chez les individus hétérozygotes apporte un niveau de résistance élevé, mais qui semble généralement plus faible que lorsque les deux allèles de résistance sont présents. Il est connu que les allèles d'un même gène peuvent avoir différentes relations de dominance.

Leurs actions cellulaires spécifiques peuvent entraîner des variations de la dominance : une dominance incomplète, par exemple, résulte de quantités intermédiaires d'une protéine codée par un gène chez l'hétérozygote (Griffiths *et al.*, 2001). Cela semble être le cas chez les hétérozygotes de la population '42055'. Les allèles au QTL *Ren5* semblent donc avoir entre eux une relation de dominance incomplète, car le phénotype des hétérozygotes serait identique à celui des homozygotes *Ren5/Ren5* dans le cas d'une dominance complète.

En ce qui concerne le niveau de sporulation, les individus qui possèdent l'allèle de résistance dominant, à l'état homozygote ou hétérozygote, ne présentent jamais de sporulation. Il semble donc que la présence d'un seul allèle de résistance au QTL *Ren5* suffise à empêcher toute sporulation chez 'Regale'. Néanmoins, il existe une corrélation aisément concevable entre le niveau de développement mycélien sur la surface de la feuille et l'observation d'une éventuelle sporulation : plus un individu autorise un développement mycélien prononcé, plus les chances d'observer un sporangiophore à la surface de la feuille sont élevées. Si la plante empêche le développement du mycélium du champignon, ce dernier ne pourra pas achever son cycle asexué et ne produira donc pas les spores indispensables à une future dissémination. D'après les observations réalisées dans ce travail sur la population '42055', un génotype ayant une notation MYC supérieure à 6 ne présentera jamais de sporulation. La présence d'un allèle de résistance au QTL *Ren5* est suffisante pour garantir cela, et le QTL mineur spécifique à la sporulation identifié sur le GL20 (voir partie B) est un des facteurs qui modulent la sporulation du champignon.

L'observation microscopique de l'effet de *Ren5* a permis de mettre en évidence des différences lors du développement précoce de l'oïdium entre les individus de la population qui possèdent le QTL *Ren5* (*Ren5+*) et ceux qui ne le possèdent pas (*Ren5-*). A 4 hpi, tous les génotypes se comportent de la même manière, et la présence d'appressorium primaires est visible chez les témoins, comme chez les individus *Ren5-* et *Ren5+*. Ces résultats indiquent que, jusqu'à ce stade de développement, aucun effet particulier dû à *Ren5* n'est visible. Le stade appressorium primaire indique le début de la phase de biotrophie chez le champignon, car il correspond à la formation d'un haustorium sous la structure appressoriale. L'action de *Ren5* n'est pas perceptible tant que l'agent pathogène n'est pas entré dans sa phase de biotrophie à proprement parler.

A 1 jpi, une différence de développement mycélien est visible entre les individus *Ren5+* et *Ren5-* : un retard de développement du champignon est constaté chez les *Ren5+*. On peut en déduire que l'action de *Ren5* est visible entre 4 et 24 hpi. *Ren5* agit donc très précocement en bloquant le développement mycélien de l'oïdium, dès le passage du stade appressorium primaire.

A 2 jpi, la différence de développement de l'oïdium sur les *Ren5+* et sur les *Ren5-* devient encore plus flagrante. De plus, alors qu'à 1 jpi les individus *Ren5-* sont encore identiques au témoin sensible de type 'Cinsault', une nette différence de développement entre *Ren5-* et 'Cinsault' est visible à 2 jpi. Cela renforce l'idée que chez les individus *Ren5-*, d'autres facteurs génétiques, vraisemblablement des facteurs présents à l'état homozygote, agissent un peu plus tardivement que *Ren5* (entre 24 et 48 hpi) pour freiner le développement mycélien. Ces facteurs assurent au final aux individus *Ren5-* un niveau de résistance partiel qui les distingue des individus totalement sensibles de type 'Cinsault'.

Dans le modèle en zig-zag décrit par Jones et Dangl (2006), la réaction de défense la plus précoce de la plante (PTI) est le résultat des défenses basales de l'hôte qui reconnaissent des PAMPs. La réaction de type ETI, quant à elle, requiert chez les organismes filamenteux comme le mildiou et l'oïdium la pénétration de l'agent pathogène et la formation d'un haustorium (Jones & Dangl, 2006), permet dans certains cas la croissance de quelques hyphes secondaires (Barker *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2008) et s'accompagne souvent d'une réaction de type HR (mort cellulaire programmée locale).

Chez les individus de la population '42055', la réaction de type HR observée le long des filaments mycéliens n'est pas spécifiquement associée à la présence de *Ren5*, puisqu'elle est observée sur tous les génotypes (voir partie B). Cet argument, associé à l'action très précoce de *Ren5*, indique que la résistance apportée par le QTL pourrait provenir des barrières préexistantes de la plante ou par la PTI, plutôt que d'une résistance de type ETI, à l'instar des conclusions apportées récemment pour le QTL *Ren4* par Ramming *et al.* (2011). Des facteurs fixés dans le génome de 'Regale' assureraient quant à eux une résistance un peu plus tardive de type ETI, générant une réaction de mort cellulaire programmée associée, quel que soit le génotype des individus au locus *Ren5*.



Néanmoins, il serait très prématuré de conclure sur ce point sans plus de données. Premièrement parce que le fait que la réaction de type HR soit observée aussi bien chez les individus *Ren5+* que *Ren5-* ne signifie pas nécessairement que *Ren5* n'y participe pas également. Deuxièmement parce que l'effet de *Ren5* est visible après la formation du premier haustorium, siège de l'échange d'effecteurs de résistance dans la réponse de type ETI. Troisièmement parce qu'il n'est pas rare que du mycélium au stade hyphes secondaire soit observé sur les individus *Ren5+* de la population '42055', ce qui est cohérent avec la définition de l'ETI dans le cadre de l'interaction vigne/oïdium (Barker *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2008). Ces arguments étayent davantage l'hypothèse d'une action de *Ren5* lors d'une réaction de défense spécifique de type ETI. Il serait donc hasardeux de conclure à ce stade de recherche sur une action de *Ren5* dans la PTI plutôt que dans l'ETI, ou inversement.

De plus, des travaux récents montrent que la détermination de la limite entre PTI et ETI est moins nette que cela n'avait été envisagé lors de leur description initiale. Selon de récentes études, les concepts de PTI et d'ETI doivent être affinés, car il existe plus un continuum qu'une discrimination nette entre les deux phases (Thomma *et al.*, 2011). La base conceptuelle de la dichotomie PTI-ETI repose sur le fait que chez la plante les récepteurs de PAMPs (ou PRRs, pour Pattern Recognition Receptors) reconnaissent des signatures microbiennes conservées, ce qui n'est pas le cas des NBS-LRRs. Cependant la limite entre les deux types de défense n'est pas toujours aussi nette. La similarité structurale de certains PRRs avec les protéines R brouille les distinctions entre la PTI et l'ETI. Par exemple, les protéines FLS2 de l'arabette (Boller *et al.*, 2000) et XA21 du riz (Song *et al.*, 1995) sont toutes deux des RLKs possédant un domaine LRR extracellulaire et un domaine kinase intracellulaire. Cependant, FLS2 et XA21 reconnaissent respectivement un PAMP (flagelline) et un effecteur (AvrXA21), ce qui déclenche les réponses PTI et ETI. Si l'on considère XA21 comme un PRR, les PRRs pourraient donc dans certains cas activer une forte réaction de défense qui ressemblerait à une résistance aux maladies médiée par une protéine R (Abramovitch *et al.*, 2006).

De plus, l'ETI est typiquement associée à une HR chez la plante, cependant certains PAMPs peuvent induire des HR chez les plantes (Bailey *et al.*, 1990; Wei *et al.*, 1992; Khatib *et al.*, 2004; Ron & Avni, 2004). La visualisation d'une HR n'est donc pas restreinte à l'ETI mais peut aussi s'observer lors des réponses de type PTI. Enfin, la PTI et l'ETI partagent des réseaux de signalisation très chevauchants (Tsuda *et al.*, 2009). Ainsi, l'intervention d'une même protéine peut être requise dans la PTI et dans l'ETI,

comme c'est le cas pour la protéine OsRac GTPase du riz (Chen & Ronald, 2011). Chez *Arabidopsis*, il a été mis en évidence l'association physique du PRR FLS2 avec trois protéines R, RPM1, RPS2 et RPS5, au sein d'un même complexe protéique (Qi *et al.*, 2011). Les auteurs de cette étude suggèrent que dans ce modèle, des interactions de signalisation se produisent très tôt entre la PTI et l'ETI, et/ou que FLS2 forme un complexe de signalisation de type PTI, dont certains acteurs interagissent avec des protéines R.

Dans le cas de *Ren5*, son action, de type PTI et/ou ETI, intervient plus précocement que celle des autres facteurs intervenant dans la résistance basale de 'Regale', mais il n'est pour le moment pas possible de tirer d'autres conclusions.

#### **IV.2 Spectre d'action de *Ren5***

Le QTL *Ren5* a été identifié en confrontant les individus de la population '42055' à la souche d'*E. necator* Chlo2b (voir Partie B). Nous avons montré que la présence du QTL *Ren5* associée aux facteurs de résistance mineurs et/ou fixés chez 'Regale' assurent à l'espèce une résistance totale à Chlo2b, souche appartenant au groupe B d'*E. necator*. Il est important de tester les nouvelles sources de résistance contre diverses populations d'agents pathogènes, pour s'assurer du potentiel de durabilité de la résistance une fois introduite dans des variétés élites de vigne sensibles. Dans ce travail, *Ren5* a été confronté à une souche du groupe A (A3) et à une autre souche du groupe B (B1).

Nos résultats indiquent que la résistance apportée par le QTL reste efficace et de même niveau vis-à-vis des deux souches A3 et B1. Aucune différence notable de croissance n'est à signaler parmi les individus de la population '42055' testés, confrontés aux souches de type B et la souche de type A. Le groupe A est caractérisé par une plus faible diversité génétique que le groupe B. Il est aussi décrit comme moins agressif que le groupe B en terme de taux de germination des conidies et d'efficacité d'infection, mais plus agressif que le groupe B en terme de période de latence, de diamètre des lésions et du nombre de spores par lésion (Montarry *et al.*, 2008). Nos expériences ne nous ont pas permis de mettre en évidence des différences de ce type, mais le but de ces expériences préliminaires était essentiellement de vérifier si le niveau de résistance apporté par *Ren5* était le même vis-à-vis de souches différentes.

De plus, des problèmes de croissance et de disponibilité du matériel pathogénique ne nous ont malheureusement pas permis d'évaluer plus de souches. Il serait donc

intéressant de tester plus de souches des deux groupes, sur un plus grand nombre de génotypes, pour véritablement évaluer le spectre d'action de *Ren5*.

Par ailleurs, aux Etats-Unis, il n'a pas été trouvé de différenciation génétique hôte spécifique parmi les populations d'agents pathogènes retrouvées sur des hôtes de type *Vitis*. A l'inverse, les populations d'*E. necator* retrouvées sur la muscadine sont génétiquement distinctes de celles que l'on trouve sur les autres espèces de *Vitis*, et présentent en outre une différence phénotypique forte avec les autres types de souches selon Brewer & Milgroom (2010). Deux hypothèses sont émises par les auteurs : soit ces populations sont dans un stade précoce de spéciation résultant d'une spécialisation d'hôte, soit les isolats qui infectent la muscadine sont capables d'éviter la reconnaissance de l'agent pathogène par les défenses de l'hôte lors d'une interaction gène pour gène (Brewer & Milgroom, 2010). Une autre étude démontre, avec des inoculations réalisées en laboratoire, une spécialisation hôte d'*E. necator* chez *Muscadinia*, mais pas parmi les autres espèces de *Vitis* (Frenkel *et al.*, 2010).

Afin de s'assurer que la résistance issue de *Ren5* est efficace contre différents types de souches et donc potentiellement plus durable dans le temps si l'on introduit le QTL dans des programmes de sélection, il serait intéressant de confronter *Ren5* à des populations d'agents pathogènes issues des régions dans lesquelles les muscadines sont endémiques.

## **V. Conclusion**

L'effet du QTL *Ren5* a été étudié dans les phases précoces de développement de l'oïdium, en utilisant la souche Chlo2b grâce à laquelle le QTL a été mis en évidence. *Ren5* agit entre 4 et 24 hpi, dès l'établissement de la phase de biotrophie du champignon, pour freiner puis stopper totalement le développement du champignon. D'autres facteurs de résistance fixés dans le génome de 'Regale' agissent un peu plus tardivement, entre 24 et 48 hpi. Ils assurent le niveau de résistance basale très élevé observé chez les descendants de 'Regale', et ce de manière indépendante de la présence du QTL majeur de résistance. Des facteurs de résistance mineurs interviennent également pour moduler les réponses, et sont responsables des variations intra-classes observées au sein des groupes de génotypes identiques au locus *Ren5*.

Le QTL *Ren5* reste efficace contre deux autres souches d'oïdium retrouvées en champ, les souches A3 et B1. Ces souches représentent les deux groupes de souches retrouvés dans les vignobles européens (A et B). Nos résultats montrent que *Ren5* est potentiellement efficace contre les deux types de souches, quel que soit leur haplotype,

ce qui constitue un résultat prometteur quant à une future utilisation de *Ren5* dans les programmes de sélection, dans le but de créer des variétés de vigne possédant une résistance durable au mildiou et à l'oïdium. Néanmoins, il faudrait confronter *Ren5* à davantage de souches pour confirmer son efficacité contre différents types d'isolats.

Par ailleurs, nos résultats indiquent encore l'importance du fond génétique et des facteurs de résistance mineurs dans le degré de résistance des plantes. Il est nécessaire de prendre en compte ces facteurs en sélection lors de la construction de nouvelles variétés résistantes, ceci afin d'assurer aux plantes un niveau de résistance optimal et surtout le plus durable possible.



CONCLUSION GENERALE  
ET  
PERSPECTIVES



## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La viticulture est une composante importante de l'agriculture française, sur le plan économique mais également social et culturel. Cependant, les variétés traditionnelles de vigne cultivée nécessitent actuellement de très nombreux traitements phytosanitaires pour lutter contre les maladies cryptogamiques qui touchent leurs parties aériennes, comme le mildiou et l'oïdium. La création de nouvelles variétés de vignes portant des facteurs de résistance à ces maladies issus de variétés résistantes apparentées à la vigne cultivée, comme l'espèce *Muscadinia rotundifolia*, présente une alternative prometteuse pour limiter les intrants au vignoble.

Dans ce contexte, les objectifs principaux de ma thèse étaient les suivants : (i) réaliser une carte génétique de *M. rotundifolia*, et une analyse comparative des génomes de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* ; (ii) identifier de nouveaux facteurs de résistance au mildiou et à l'oïdium chez *M. rotundifolia* utilisables à terme en sélection.

Les expériences que j'ai réalisées lors de ce travail ont effectivement abouti à la création d'une carte génétique de *M. rotundifolia* cv. Regale comportant 191 marqueurs microsatellites et couvrant 950 cM, soit près de 80% de la carte génétique de référence pour *V. vinifera* (Doligez *et al.*, 2006). Cette carte compte 20 groupes de liaison (GL), ce qui est cohérent avec le nombre chromosomique attendu pour *M. rotundifolia*. De manière générale, la macrosynténie est très bien conservée entre les marqueurs des cartes génétiques de *M. rotundifolia* et de *V. vinifera*. Le GL20 de *M. rotundifolia* correspond à la partie inférieure du GL7 chez *V. vinifera*, la partie supérieure du GL7 de *V. vinifera* étant homologue au GL7 de *M. rotundifolia*. Mes travaux de thèse ont également permis la mise en évidence d'un QTL de résistance au mildiou expliquant environ 25% de la variation observée a été détecté sur le GL18 de *M. rotundifolia*, et d'un nouveau QTL de résistance à l'oïdium expliquant jusqu'à 58% de la variabilité phénotypique observée. Ce dernier, baptisé *Ren5* pour '*Resistance to Erysiphe necator 5*', a été localisé dans la partie supérieure du GL14 de *M. rotundifolia*. *Ren5* agit précocement en retardant, puis en bloquant complètement la croissance du mycélium du champignon, dès l'établissement des premiers stades de biotrophie de l'agent pathogène. L'efficacité de ce QTL a été démontrée contre deux souches d'oïdium du groupe B (Chlo2b et B1) et une souche du groupe A (A3), qui constituent les deux groupes de souches retrouvés en Europe.



### **Cartographie génétique et analyse de la structure du génome de *M. rotundifolia***

La carte génétique établie au cours de ma thèse, bien que comportant moins de marqueurs moléculaires que la carte réalisée par Riaz *et al.* (2012), a permis la mise en évidence du GL20 de la muscadine, puis, par comparaison avec les cartes de *V. vinifera*, d'inférer sur l'origine de ce GL représentant vraisemblablement le chromosome 20 de l'espèce. Les expérimentations préliminaires d'hybridation en fluorescence in situ (FISH) réalisées à la plateforme de Cytogénétique Moléculaire de l'INRA de Rennes, semblent d'ores et déjà confirmer l'hypothèse selon laquelle le GL20 de *M. rotundifolia* constitue effectivement le chromosome 20 de la muscadine. Ces résultats devront être répétés et confirmés, mais ils sont néanmoins très encourageants quant à la validité de cette hypothèse.

La macrosynténie très conservée entre *M. rotundifolia* et de *V. vinifera* ne permet pas, pour le moment, d'inférer sur les régions chromosomiques qui sont potentiellement à l'origine des barrières aux croisements interspécifiques constatées entre les deux espèces depuis plus d'un siècle par les sélectionneurs (Detjen, 1919a, 1919b; Dunstan, 1962; Olmo, 1971; Bouquet, 1981; Olmo, 1986).

Différents types de barrières aux croisements entre la muscadine et la vigne européenne sont présentes. Pour Patel et Olmo (1955), la raison de l'échec des croisements *M. rotundifolia* x *V. vinifera* (la muscadine est le parent femelle) n'est pas dû à un échec de formation du tube pollinique, mais à des barrières localisées dans le sac embryonnaire. Lu et Lamikanra (1996) ont complété ces résultats en affirmant, au contraire, que la cause majeure d'échec de ces croisements était l'avortement de la croissance du tube pollinique dans les stylets de *Muscadinia*, mais que des barrières existaient également entre le stylet et le sac embryonnaire. Les barrières aux croisements *M. rotundifolia* x *V. vinifera* sont donc essentiellement prézygotiques.

Cependant, les difficultés à obtenir des plantes fertiles observées dans les croisements *Vitis* x *Muscadinia* (qui constitue la majorité des croisements réalisés entre les deux espèces) seraient quant à elles dues à des barrières postzygotiques, car aucune barrière au niveau des stylets n'a été détectée dans ces croisements (Lu *et al.*, 1996). Lors de la réalisation de tels croisements, Patel et Olmo (1955) ont décrit la formation de bivalents, mais également d'un certain nombre d'univalents, c'est-à-dire de chromosomes entiers incapables de s'apparier avec leurs homologues de l'autre espèce. Selon Bouquet (1983), la stérilité des hybrides *V. vinifera* x *M. rotundifolia* peut être

considérée comme de nature essentiellement chromosomique. Cependant d'autres facteurs, probablement génétiques, sont susceptibles d'intervenir également (Bouquet, 1983). Pour Stebbins (1958), un faible appariement chromosomique lors de la méiose peut être dû soit à un manque total ou partiel d'homologie structurale entre les chromosomes, soit à une mauvaise synchronisation des différents processus métaboliques impliqués dans les premiers stades de la méiose, ces deux causes n'étant pas exclusives. On pourrait donc supposer que les espèces *V. vinifera* et *M. rotundifolia* ne possèdent des génomes que partiellement homologues, un certain nombre de leurs chromosomes ayant subi une différenciation structurale plus ou moins marquée, comme en attestent les travaux de Jelenkovic & Olmo (1968). Cependant nos résultats permettent d'affirmer que ce n'est pas le cas, puisque la macrosynténie est parfaitement conservée entre les deux espèces. Il est alors possible que des gènes présents chez l'un et/ou chez l'autre des parents aient une action sur le déroulement de la méiose des hybrides, et en particulier sur les phénomènes d'appariements chromosomiques (Bouquet, 1983). La fertilité des hybrides entre les deux espèces, et par conséquent leur aptitude à être rétrocroisés par *V. vinifera*, est vraisemblablement déterminée par un complexe de gènes qui influencent la fertilité gamétique en contrôlant l'appariement chromosomique au cours de la méiose. L'identification de ces facteurs permettrait d'envisager la sélection d'hybrides à fertilité partiellement ou totalement restaurée. Cela aurait pour effet d'augmenter les possibilités de recombinaison génétique entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia*, et par conséquent d'exploiter de manière optimale la muscadine pour l'amélioration génétique de la vigne cultivée. Mais à l'heure actuelle, l'organisation de certaines régions chromosomiques est encore mal connue. Une connaissance plus fine de la structure génomique et de la séquence du génome de *M. rotundifolia* est nécessaire.

Ainsi, la connaissance de la colinéarité entre les génomes de *M. rotundifolia* et de *V. vinifera* pourrait être complétée par la mise en commun des informations génétiques des deux cartes générées pour la muscadine à ce jour (Blanc *et al.*, 2012; Riaz *et al.*, 2012), puis par l'intégration de nouveaux marqueurs moléculaires dans ces cartes génétiques. Des marqueurs de type SNP spécifiques à la muscadine sont actuellement en cours d'identification à l'URGI (Evry, France). Un projet d'établissement d'une carte consensus de référence pour *M. rotundifolia*, qui intégrerait les marqueurs SSR des cartes génétique de 'Regale' (Blanc *et al.*, 2012) et de 'Fry x Trayshed' (Riaz *et al.*,

2012), ainsi que des marqueurs SNP, est en cours de réalisation.

Pour aller plus loin dans la connaissance de la génétique de *M. rotundifolia*, le génome doit être séquencé avec suffisamment de profondeur pour répondre aux questions évolutives et permettre une meilleure utilisation de la remarquable résistance de la muscadine aux maladies. Une séquence du génome de la muscadine devrait être prochainement disponible, puisque sept variétés de muscadine ont été choisies pour être réséquencées. Ce travail facilitera la réalisation d'études de génomique comparative entre *M. rotundifolia* et *V. vinifera*, et la compréhension des mécanismes associés à l'introgession chez *V. vinifera* de gènes de résistance de *M. rotundifolia*.

D'autre part, un QTL mineur de résistance à l'oïdium a été identifié dans la partie supérieure du GL20 de *M. rotundifolia*, à proximité du point de cassure chromosomique. Les informations de séquence permettront donc également d'amener à une résolution de la relation précise entre clusters de gènes R et points de cassures chromosomiques qui peuvent être détectés en comparant des genres apparentés (Mazourek *et al.*, 2009), dans notre cas *M. rotundifolia* et *V. vinifera*.

### **QTL de résistance au mildiou et à l'oïdium dans le cadre de la création variétale**

Les caractéristiques jusqu'à présent présentées par *Ren5* en font un très bon candidat pour intégrer un futur programme de sélection de variétés résistantes chez la vigne. Néanmoins, il faudra au préalable confronter *Ren5* à un plus grand nombre de souches pathogènes pour déterminer la largeur de son spectre d'action, et ainsi évaluer correctement son potentiel de durabilité en champ. En effet, pour maximiser le potentiel de durabilité des nouvelles variétés produites, il est nécessaire, en plus du pyramidage de plusieurs gènes et de l'association de différents mécanismes d'action, d'utiliser si possible des gènes de résistance à large spectre.

Chez la vigne, plusieurs programmes de sélection visant à la création de variétés de cuve, de table ou à jus sont en cours de réalisation à l'INRA. Dès 2016 sera possible l'inscription de variétés de cuve à résistance oligogénique au mildiou et à l'oïdium (*Run1*, *Rpv1* et des facteurs de résistance issus de 'Regent'), bien qu'en 2013 serait déjà possible la première inscription de variétés de cuve présentant une résistance monogénique (*Run1*, *Rpv1*). Compte-tenu des connaissances accumulées à ce jour sur le contournement des résistances aux agents pathogènes, il semble très risqué de déployer des variétés de vigne à résistance monogénique totale. Un contournement de ces

résistances rendrait non seulement caduque l'utilisation de ces variétés, mais compromettrait également l'usage de ces gènes dans de futures variétés. Les gènes de résistance sont en effet susceptibles d'être contournés par l'agent pathogène à plus ou moins long terme. Le premier cas avéré de contournement chez la vigne était celui de *Rpv3*, QTL de résistance au mildiou identifié dans la variété hongroise 'Bianca' et qui a été contourné par la souche Lednice (Peressotti *et al.*, 2010). Fin 2010, des symptômes d'oïdium ont été observés aux Etats-Unis sur des vignes possédant le gène *Run1* (Cadle-davidson *et al.*, 2011). Chez d'autres plantes d'intérêt agronomique, le déploiement à grande échelle de gènes de résistance associé à l'évolution rapide des souches d'agents pathogènes a déjà abouti à leur contournement, ce qui les rend inutilisables, comme c'est le cas par exemple pour les gènes R de résistance au mildiou chez la pomme de terre. Il est donc primordial pour la création de nouvelles variétés de définir des règles d'exploitation des sources de résistance à notre disposition, dans le but de maximiser la durée d'utilisation des gènes de résistance introgressés. En premier lieu, il est important de privilégier la mise sur le marché de variétés cumulant plusieurs gènes de résistance. Dans l'avenir, de nouvelles variétés pourront être créées, intégrant des QTL de résistance tels que *Rpv2*, ou le nouveau facteur identifié dans ce travail, *Ren5*.

### **Résistances dominantes, résistances récessives et durabilité**

Les programmes de sélection pour la résistance ont pour but d'introgesser des gènes R issus d'espèces sauvages dans des variétés cultivées. Jusqu'à présent, seuls des gènes et QTL de résistance dominants ont été mis en évidence chez la vigne, le QTL *Ren5* nouvellement identifié ne dérogeant pas à ce constat. Les résistances dominantes sont très efficaces et souvent spécifiques à une race d'agent pathogène, mais la résistance conférée par les gènes R est susceptible d'être contournée par les pathogènes (voir Introduction), ce qui conduit à de larges épidémies et rend inefficaces les variétés en plein essor (Van Der Hoorn *et al.*, 2002; Panstruga & Dodds, 2009). Cela force les sélectionneurs à introduire des cultivars possédant de nouveaux facteurs de résistance.

En contraste avec les résistances dominantes, il a été montré chez plusieurs espèces de plantes que les résistances récessives pouvaient conduire à une résistance durable et large spectre des cultivars. Par exemple, trois QTL de résistance récessifs identifiés chez la laitue sauvage *Lactuca saligna* suffisent à apporter une résistance durable et efficace contre le mildiou dans les cultivars cultivés (Zhang *et al.*, 2009). La résistance apportée par le locus de résistance à l'oïdium *mlo* chez l'orge (Jørgensen, 1992;

Büschges *et al.*, 1997) est encore efficace au champ plusieurs décennies après son introduction en culture.

Dès lors, en contraste avec l'étude des gènes R, un nombre grandissant d'études se focalisent aujourd'hui sur des gènes appelés « gènes S » (pour Susceptibility, en français Sensibilité). Le terme de gène S a été introduit pour la première fois dans la revue d'Eckhardt (2002). D'un point de vue génétique, les gènes S peuvent être définis comme des gènes dominants, nécessaires pour le développement de l'agent pathogène, et dont la perte de fonction conduira à une résistance récessive (Pavan *et al.*, 2010). Il a été montré que la perte de fonction d'un gène S conduit souvent à une résistance durable et à large spectre, comme c'est le cas pour la résistance basée sur le locus *mlo* par exemple. La famille de gènes *Mlo* code pour des protéines à sept domaines transmembranaires, dont la topologie rappelle celles des récepteurs couplés à des protéines G présents chez les animaux et les champignons (Devoto *et al.*, 2003). Les effecteurs de virulence de l'agent pathogène cibleraient les protéines *mlo* fonctionnelles pour promouvoir la pénétration du champignon dans les cellules épidermiques (Jones & Dangl, 2006; Panstruga, 2005). La résistance à l'oïdium conférée par le gène *erl* chez le pois, et également durable jusqu'à présent, est associée à des mutations pertes de fonction d'un locus homologue de *mlo* (Pavan *et al.*, 2011). C'est également le cas du locus *ol-2* de la tomate, qui s'est avéré efficace envers plusieurs isolats d'oïdium testés à travers le monde (Bai *et al.*, 2005, 2008). Par conséquent, l'exploitation des allèles de gènes S pourrait fournir une alternative aux stratégies de croisement conventionnelles, complémentaire à la résistance conférée par les gènes R.

A ce jour, des gènes S potentiels ont été caractérisés chez plusieurs espèces végétales, principalement chez *Arabidopsis*. Des mutants *mlo* ont été identifiés chez d'autres espèces de plantes dont *Arabidopsis*, la tomate et le pois (Consonni *et al.*, 2006; Fondevilla *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2008). Une famille de gènes *Mlo* comprenant dix-sept membres *Vvmlo* (pour *Vitis vinifera mlo*) a également été mise en évidence chez la vigne (Feechan *et al.*, 2008; Winterhagen *et al.*, 2008). Pour exploiter au mieux ces gènes dans les programmes de sélection de variétés résistantes, il faudrait tout d'abord examiner s'il existe des gènes S orthologues dans différentes espèces de vigne, à l'instar de *Vvmlo*. Des études de génomique et de génétique comparative apporteront des réponses à cette question. Le génome de la vigne est séquencé depuis 2007 et celui de

*M. rotundifolia* le sera très prochainement, ce qui constitue une mine d'informations utilisables par la communauté scientifique.

Passer au crible les ressources génétiques disponibles dans les core-collections serait un moyen pour rechercher des allèles récessifs de gènes S naturels chez la vigne. Une fois des gènes S candidats de type *Vvml0*, par exemple, identifiés, leur amplification puis leur séquençage dans les différentes accessions des collections de vigne pourraient être réalisés dans le but d'explorer leur diversité. Cela pourrait dans le même temps permettre d'identifier des allèles candidats de sensibilité, compte tenu de ce que l'on connaît sur les organismes modèles. Afin d'analyser la relation entre la diversité allélique et le phénotype (résistance ou sensibilité), les accessions intéressantes devront être autofécondées pour fixer les gènes à l'état homozygote. Cette étape est nécessaire du fait de la nature récessive des allèles de résistance des gènes S.

Les gènes S peuvent être caractérisés fonctionnellement grâce à des approches de 'gene silencing', comme le virus-induced gene silencing (VIGS), technique d'inactivation transitoire de gènes appliquées aujourd'hui chez de nombreuses espèces (Ratcliff *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2002; Hileman *et al.*, 2005; Burch-Smith *et al.*, 2006), ou la technique d'ARN interférence (RNAi) qui permet d'obtenir un effet de silencing stable d'un gène (Waterhouse & Helliwell, 2003). Ces méthodes permettraient d'observer des phénotypes modifiés vis-à-vis de la résistance à des agents pathogènes comme le mildiou ou l'oïdium, par exemple.

Si la fonction d'un gène est confirmée, et si cribler une collection de plantes ne suffit pas à détecter des allèles naturels de résistance récessifs, des mutations « perte de fonction » du gène S peuvent être effectuées, par exemple avec la technique de TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) (Colbert *et al.*, 2001). L'application du TILLING est particulièrement intéressante, puisqu'elle permet une identification efficace des mutations d'intérêt tout en présentant l'avantage d'être une technologie non-transgénique. Cependant, il faudrait tout d'abord étudier la faisabilité de ces techniques sur le modèle 'vigne', connu pour être plus difficile à exploiter que la plupart des autres plantes modèles.

En conclusion, seuls des gènes R dominants ont été mis en évidence chez la vigne jusqu'à présent. Pour assurer la création de nouvelles variétés à résistance durable, il serait avantageux d'approfondir la recherche sur les gènes S. L'association de résistances dominantes et récessives en sélection dans le futur augmentera probablement les chances de commercialiser des variétés possédant une résistance aux maladies durable et à large spectre. Cependant, il faut prendre en compte que les traitements fongicides utilisés à l'heure contrôlent également d'autres maladies cryptogamiques touchant la vigne, comme le Black rot. Dans le cadre d'une réduction de la quantité d'intrants phytosanitaires apportée aux cultures et de la création de variétés naturellement résistantes, il serait donc également important d'intégrer aux nouvelles variétés des facteurs de résistance à ces maladies.

# ANNEXES



**ANNEXES**

**Annexe 1 :**

**Comparaison de la macrosynténie entre les chromosomes des cartes génétiques de *M. rotundifolia* (Blanc *et al.*, 2012) et de *V. vinifera* (Doligez *et al.*, 2006)**

**Annexe 2 :**

**Article publié dans Theoretical and Applied Genetics (en ligne depuis le 03/08/2012)**

**Annexe 3 :**

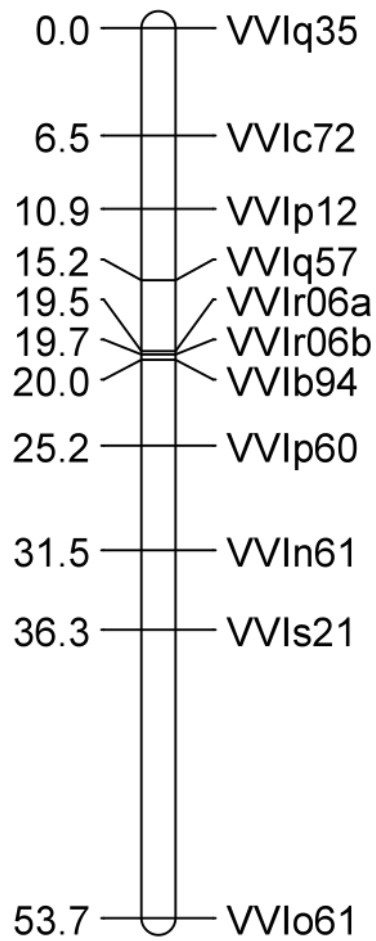
**Liste des tableaux**

**Annexe 4 :**

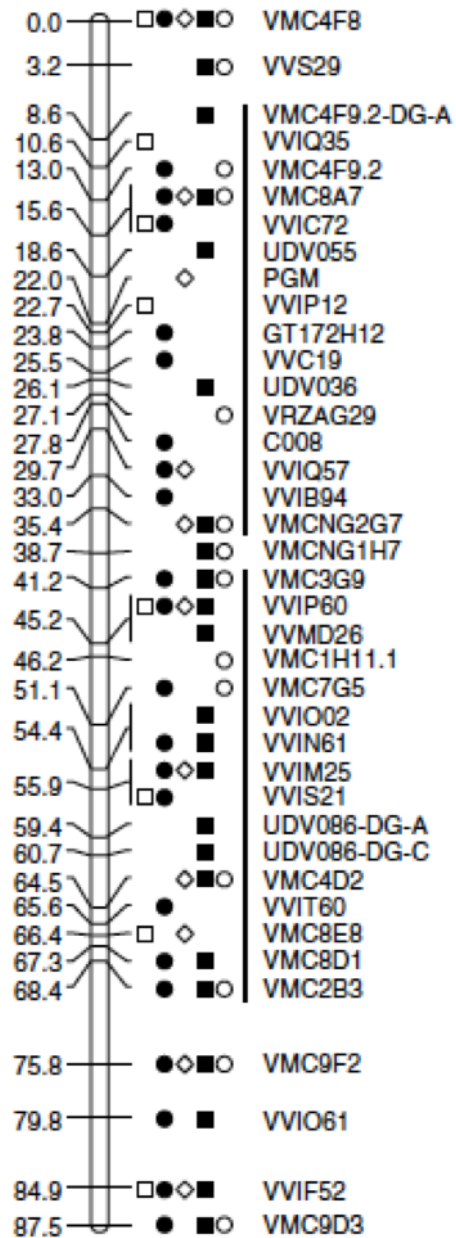
**Liste des figures**

**Annexe 1 : Comparaison macrosyténique des chromosomes des cartes génétiques de *M. rotundifolia* et *V. vinifera***

*M. rotundifolia* GL1

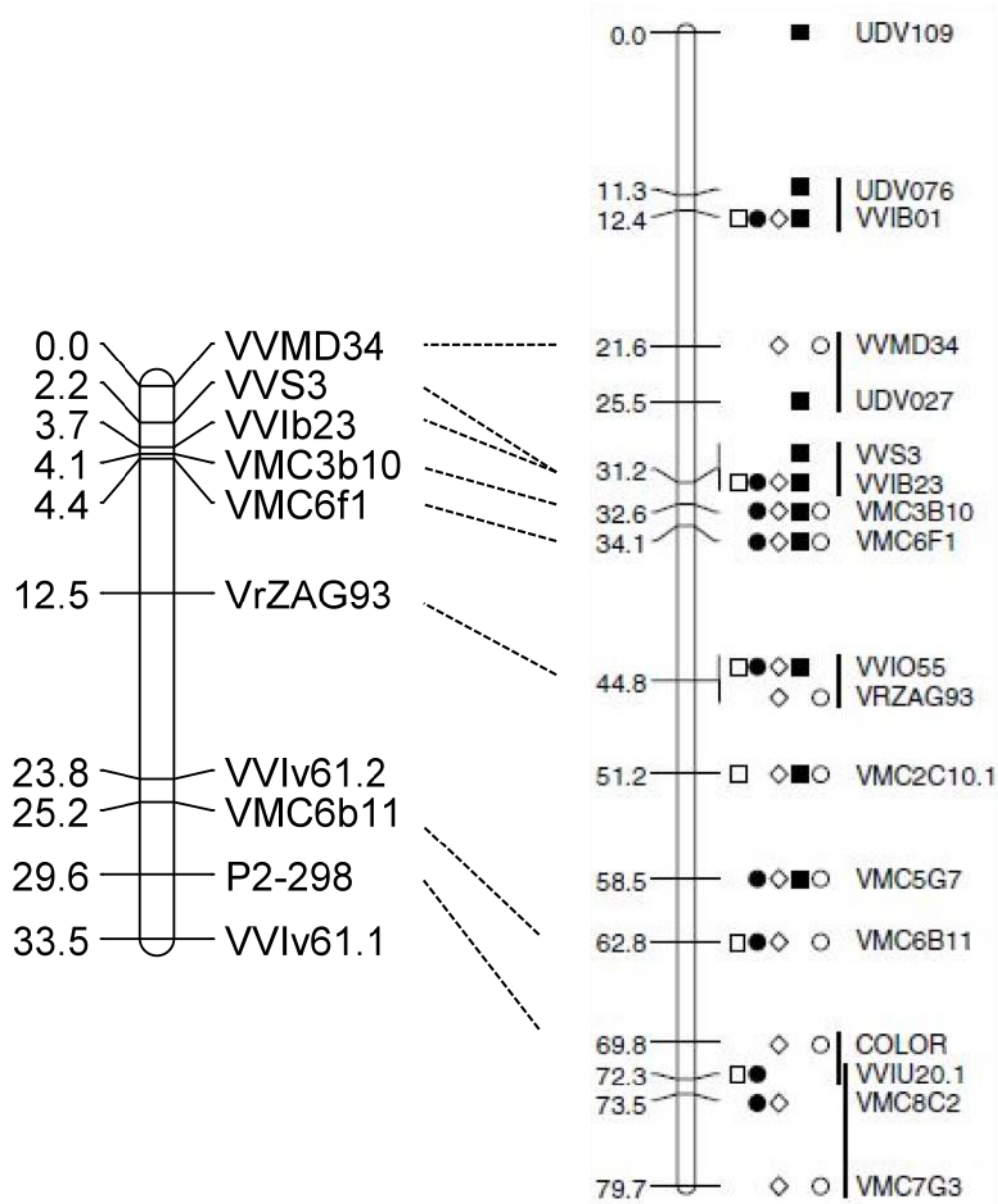


*V. vinifera* GL1

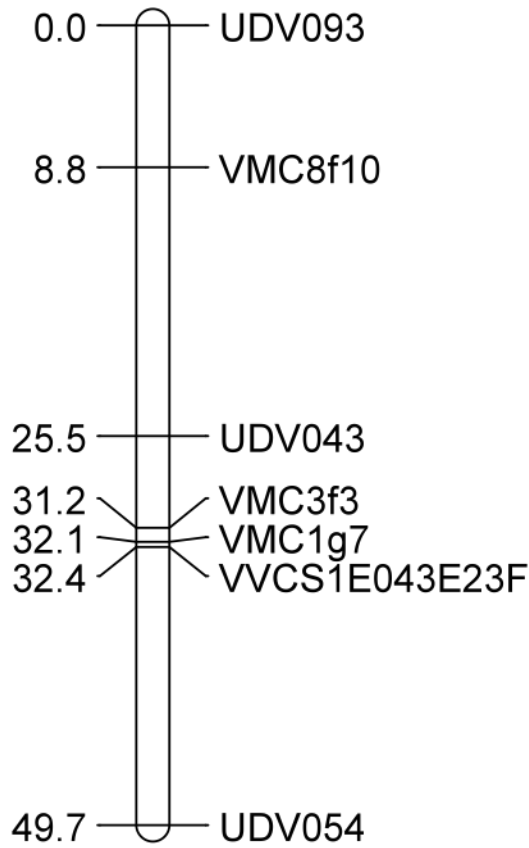


*M. rotundifolia* GL2

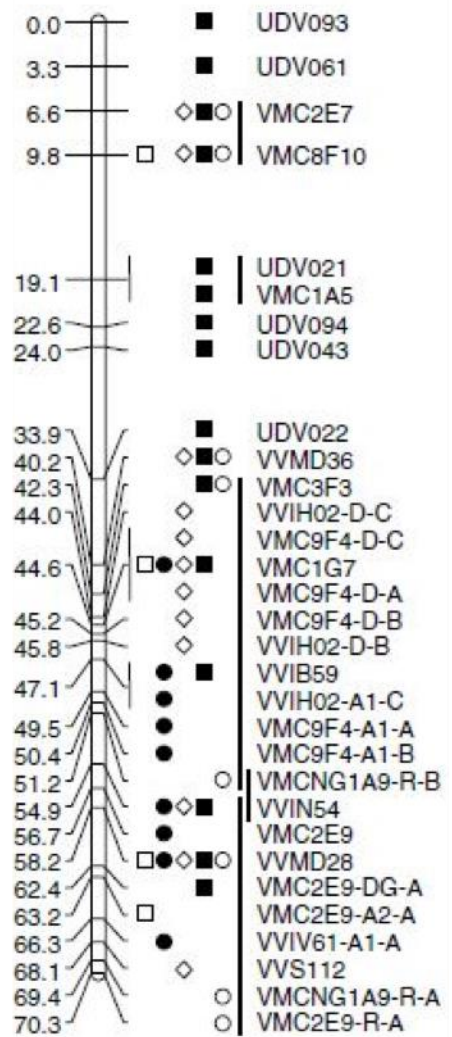
*V. vinifera* GL2



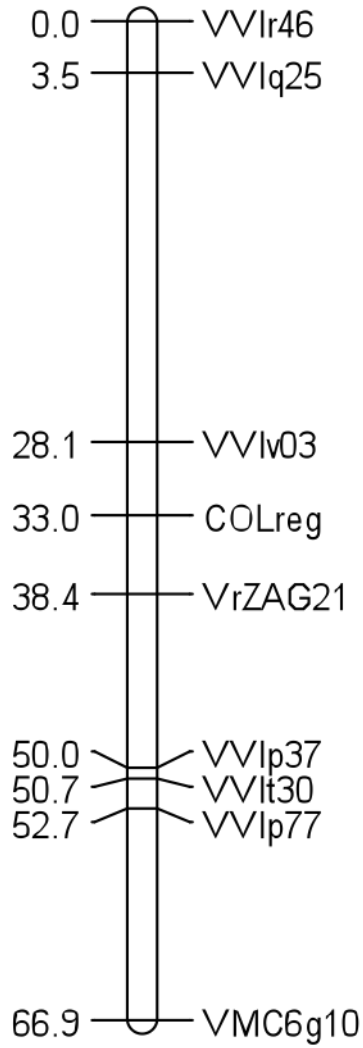
*M. rotundifolia* GL3



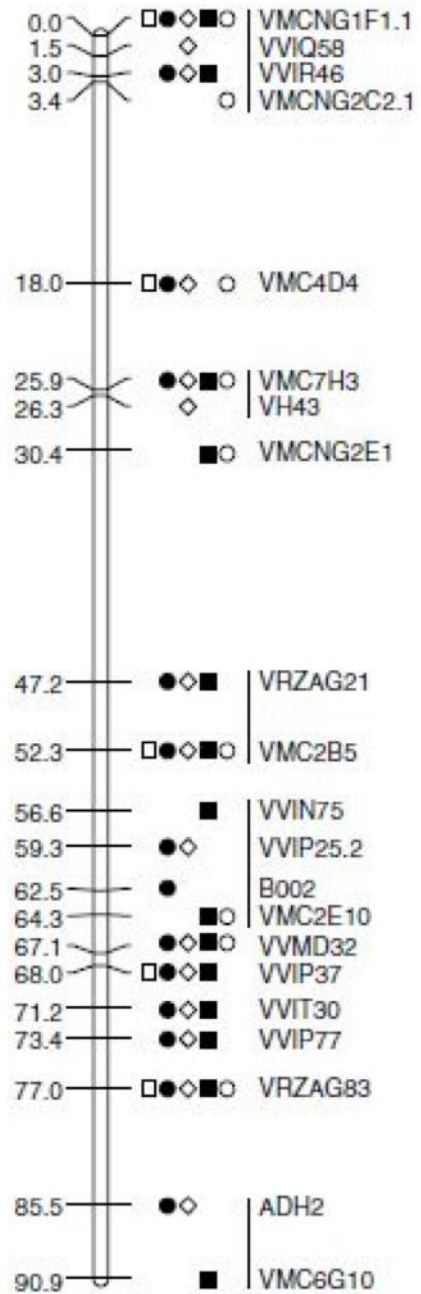
*V. vinifera* GL3



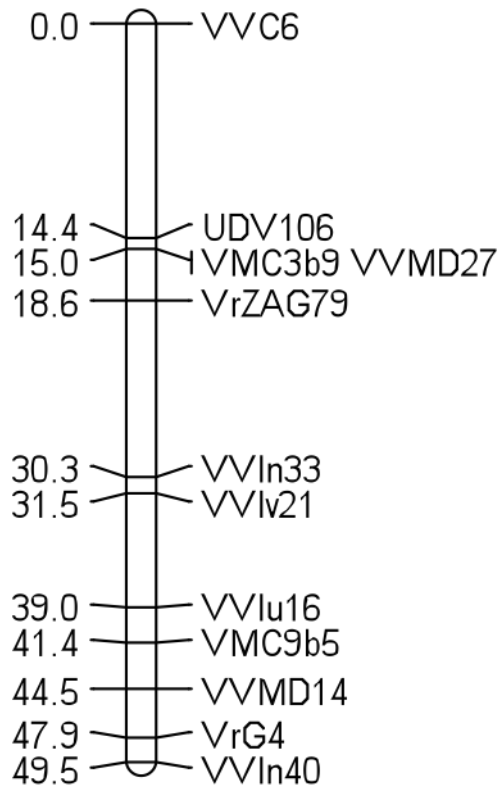
*M. rotundifolia* GL4



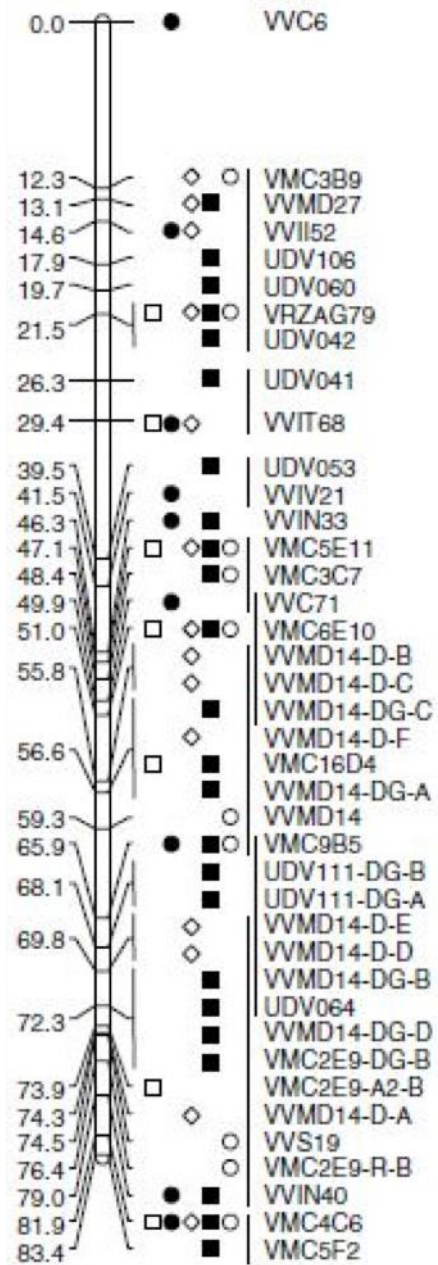
*V. vinifera* GL4



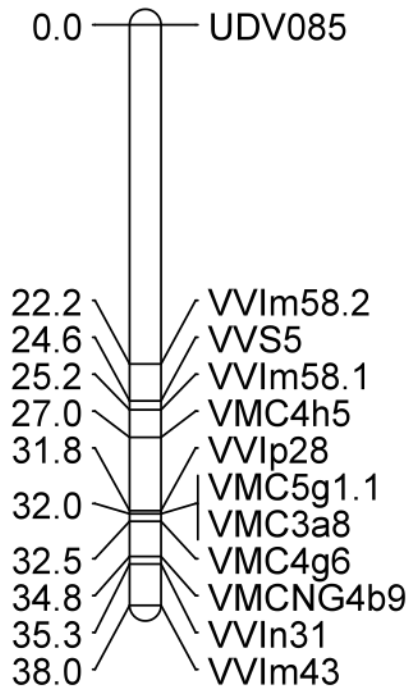
*M. rotundifolia* GL5



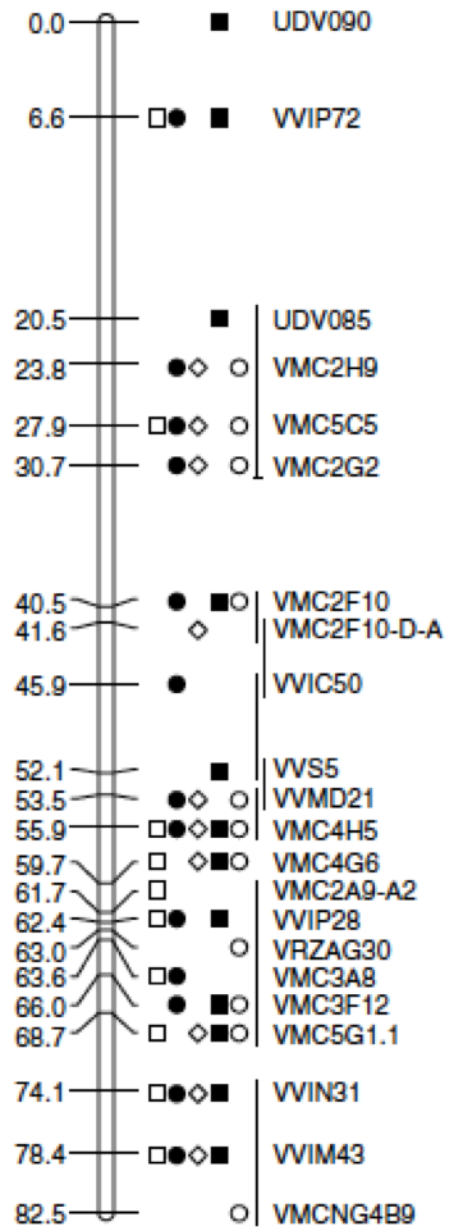
*V. vinifera* GL5



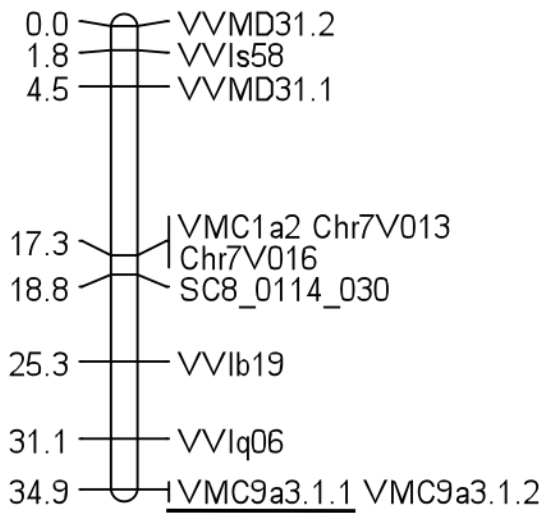
*M. rotundifolia* GL6



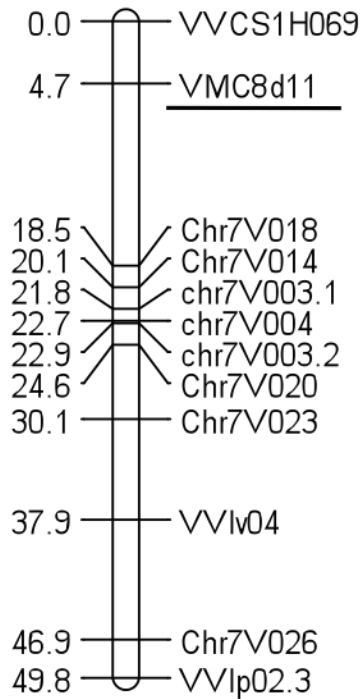
*V. vinifera* GL6



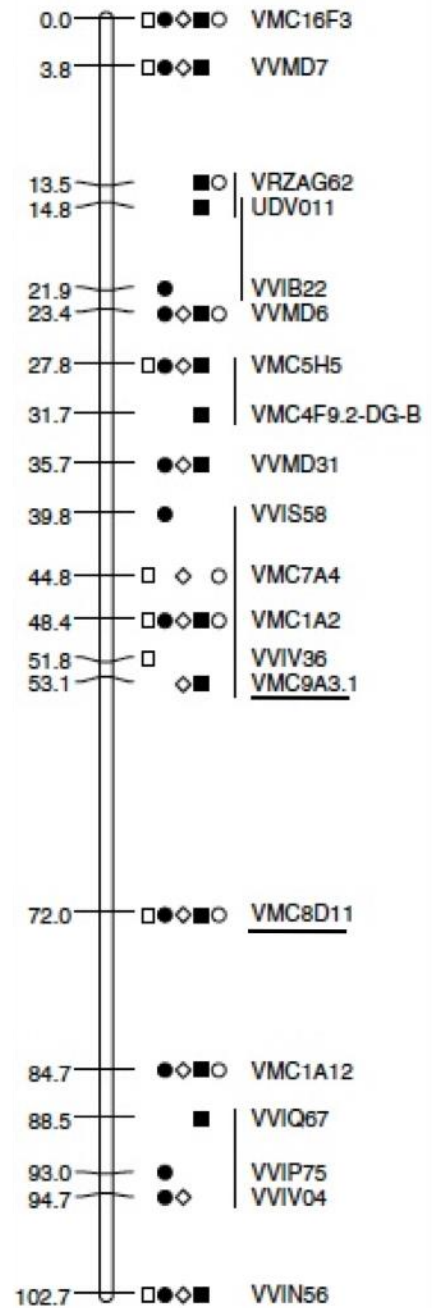
***M. rotundifolia* GL7**



***M. rotundifolia* GL20**

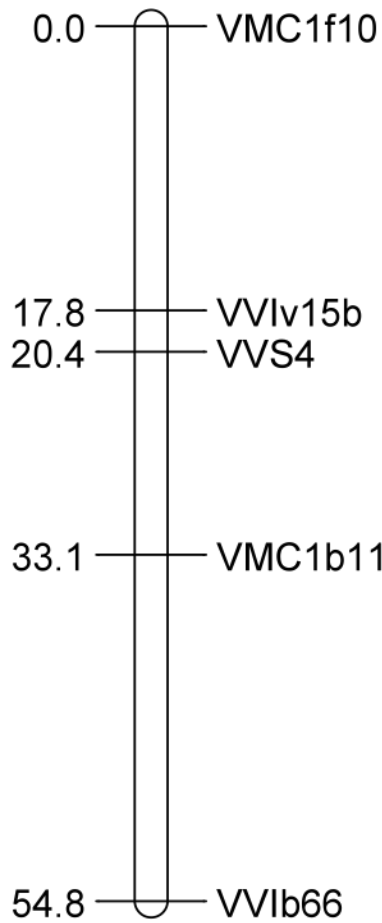


***V. vinifera* GL7**

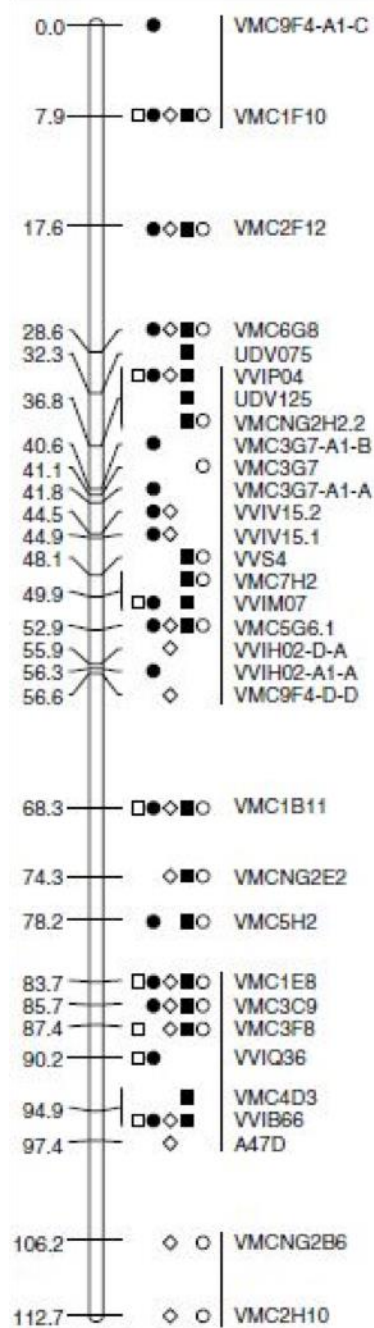




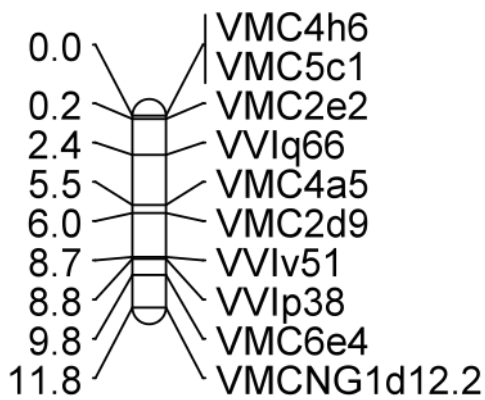
*M. rotundifolia* GL8



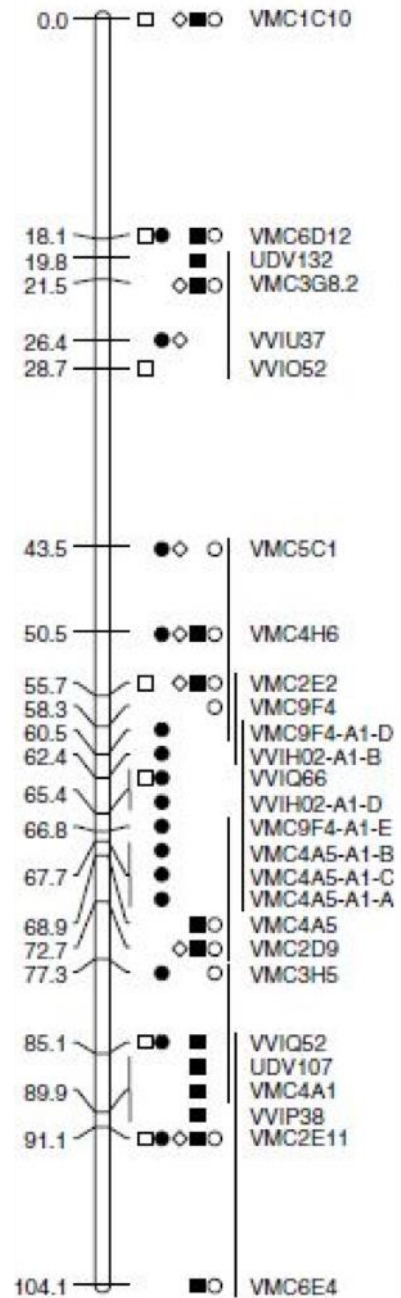
*V. vinifera* GL8



*M. rotundifolia* GL9



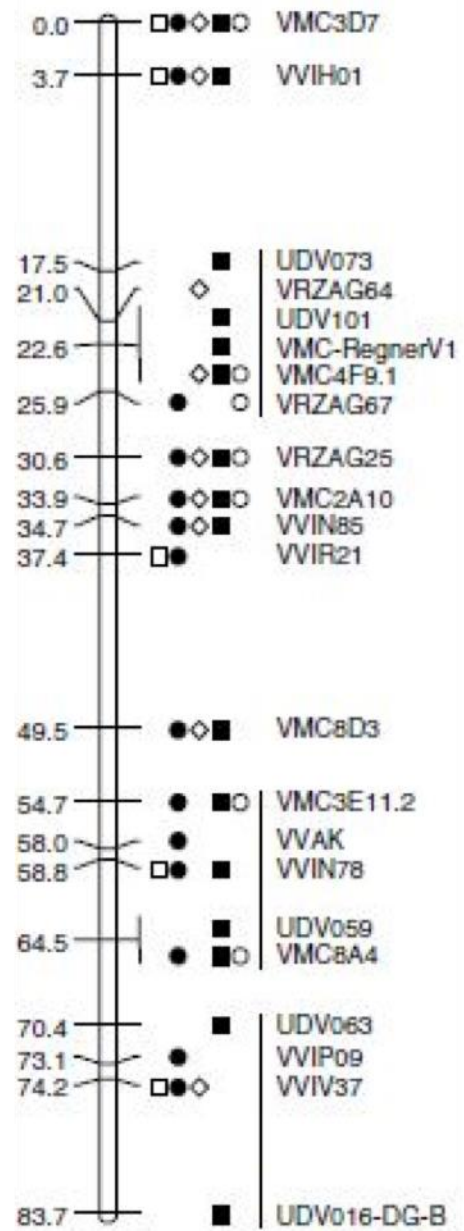
*V. vinifera* GL9



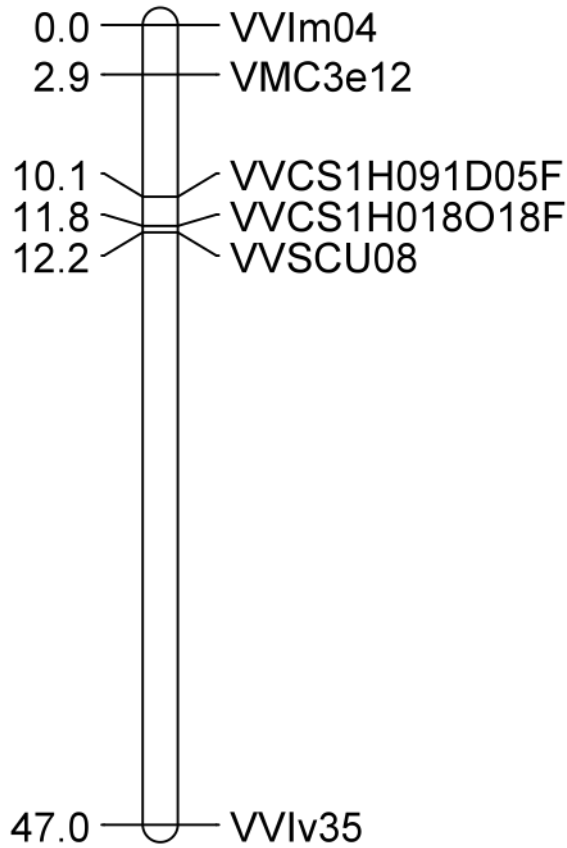
*M. rotundifolia* GL10



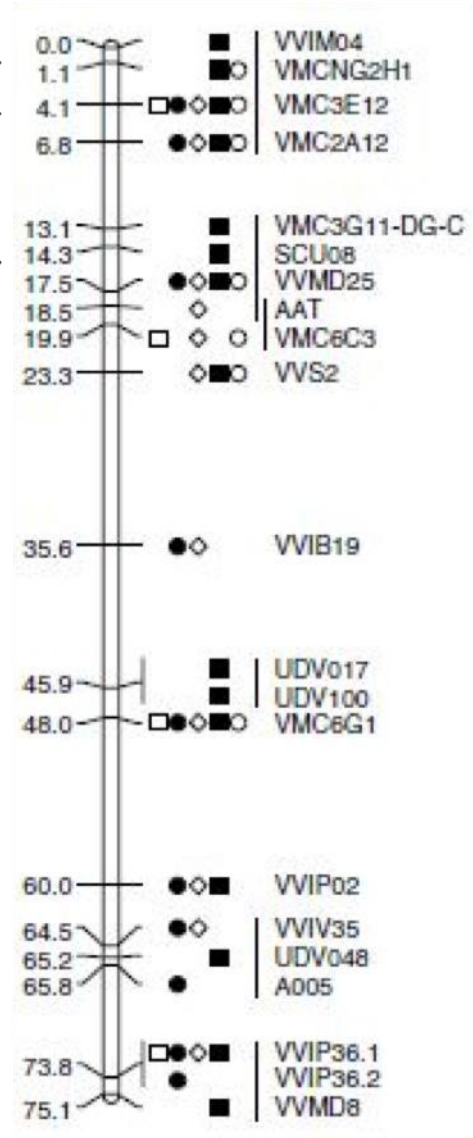
*V. vinifera* GL10



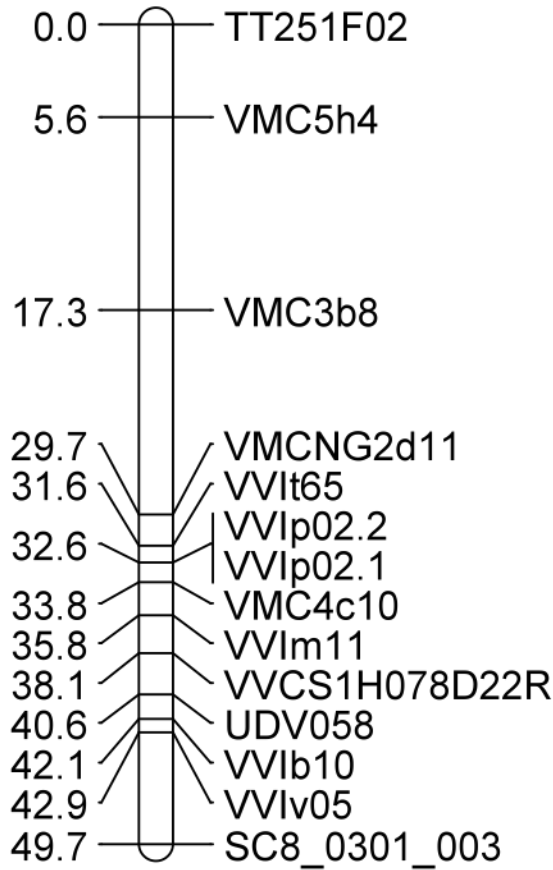
*M. rotundifolia* GL11



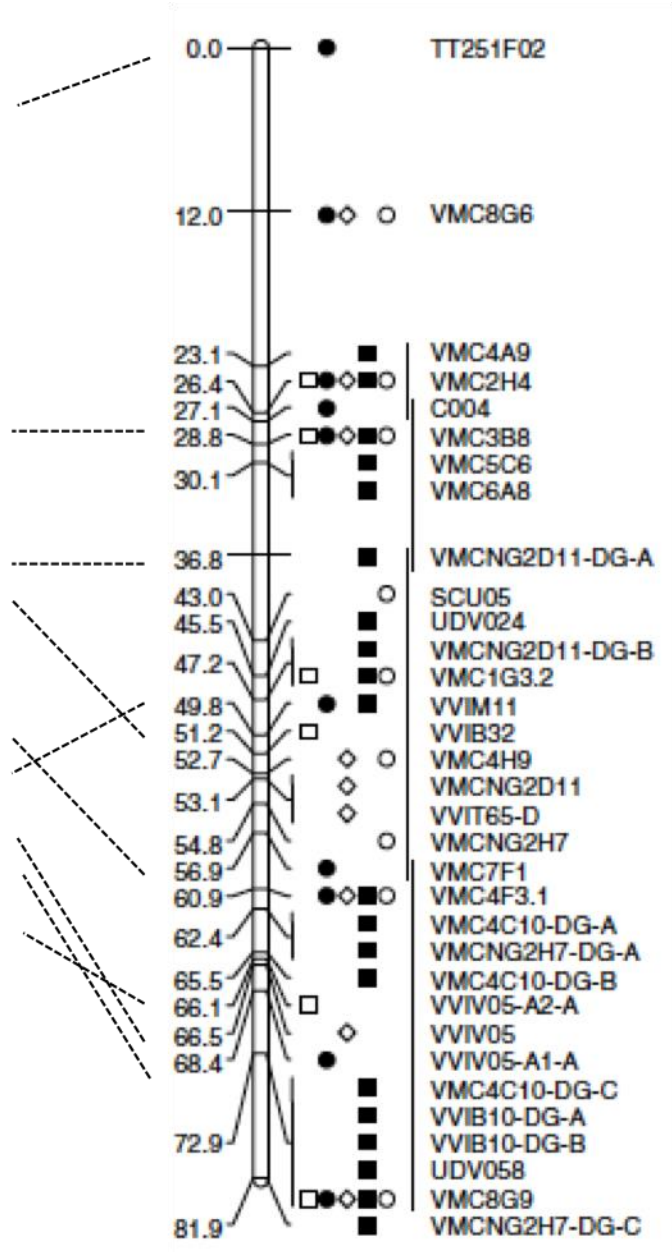
*V. vinifera* GL11



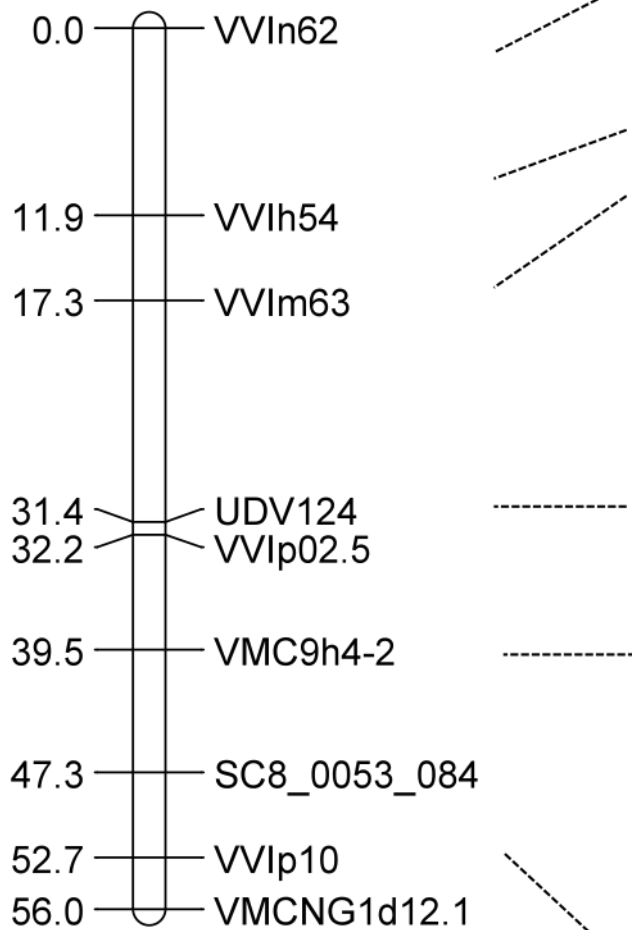
*M. rotundifolia* GL12



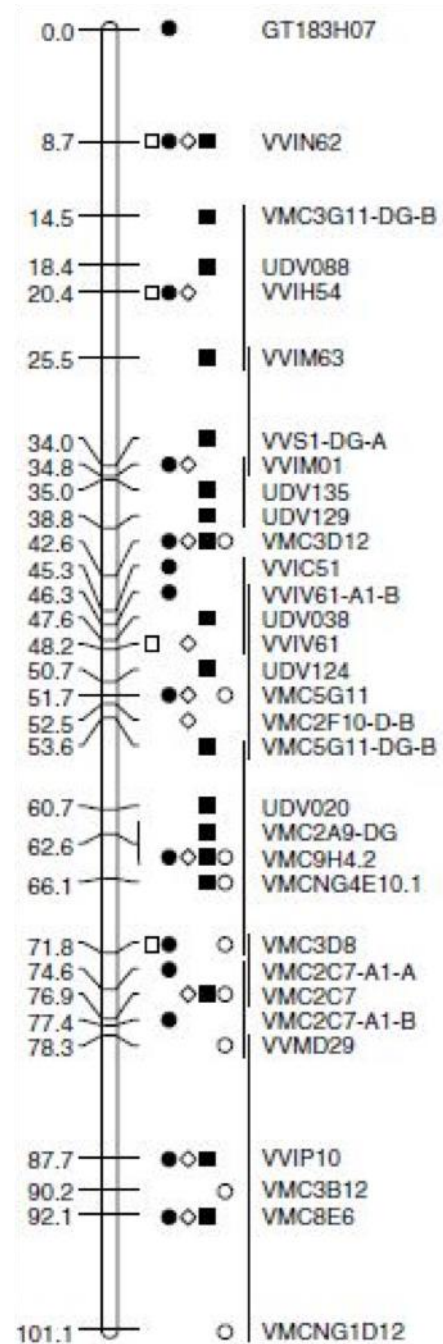
*V. vinifera* GL12



*M. rotundifolia* GL13

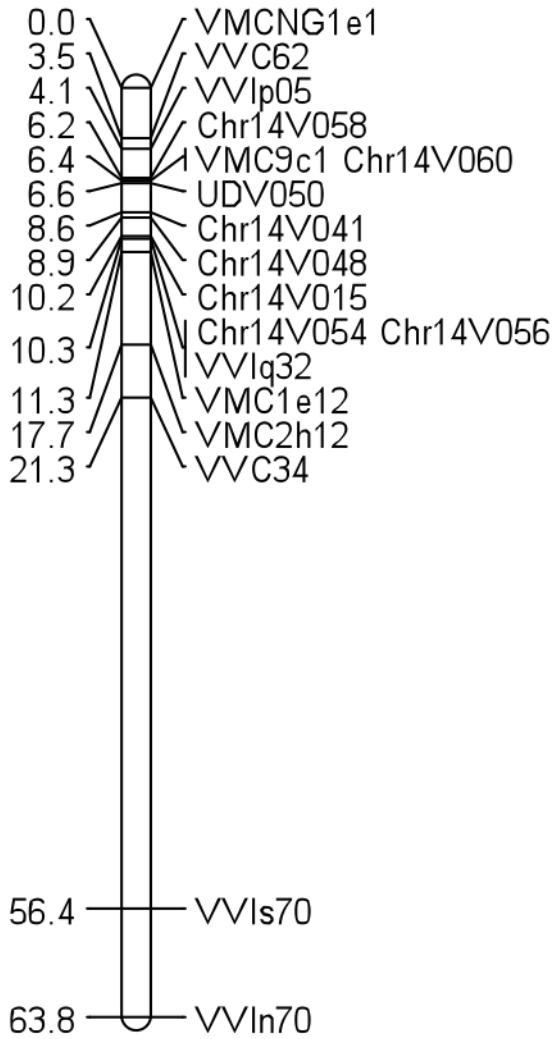


*V. vinifera* GL13

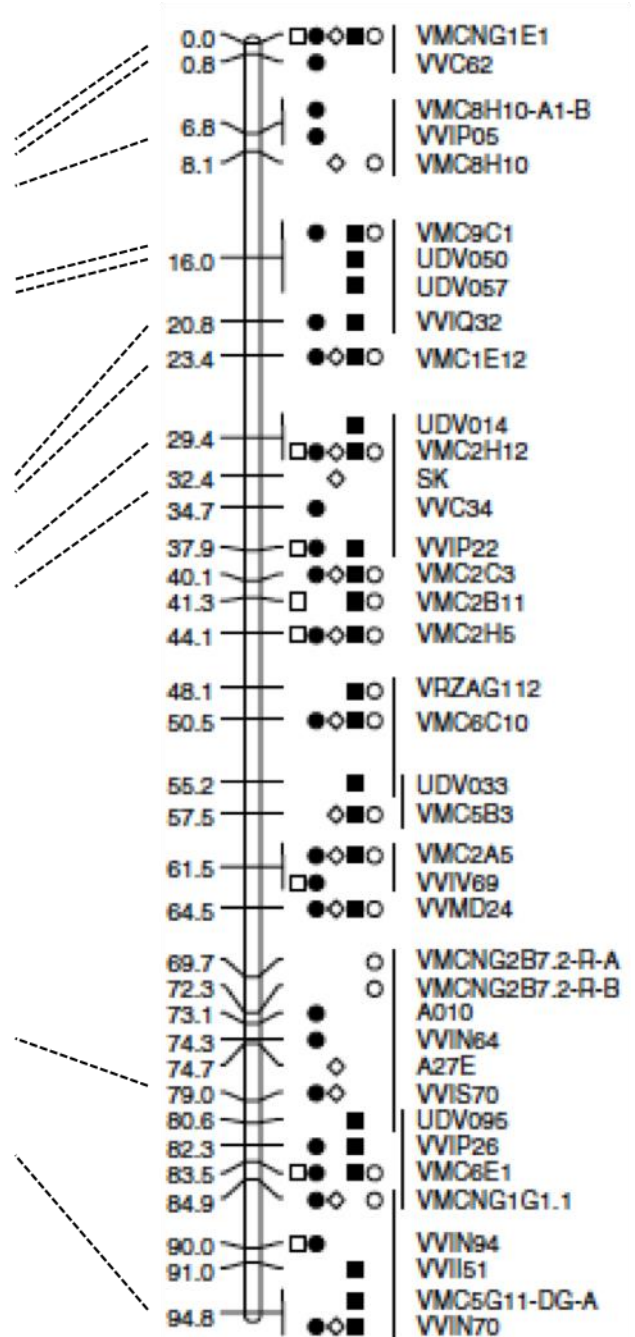




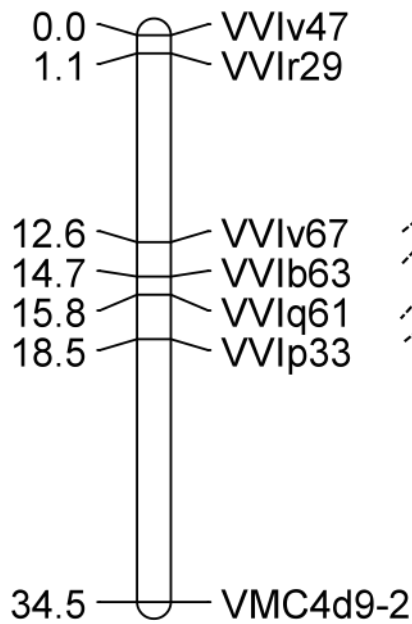
*M. rotundifolia* GL14



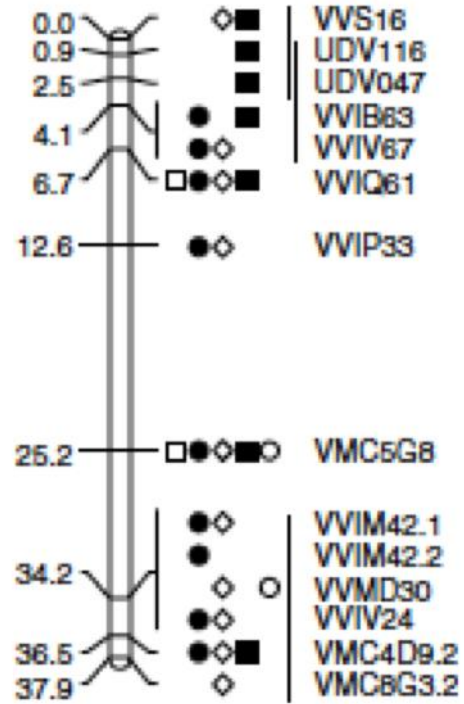
*V. vinifera* GL14



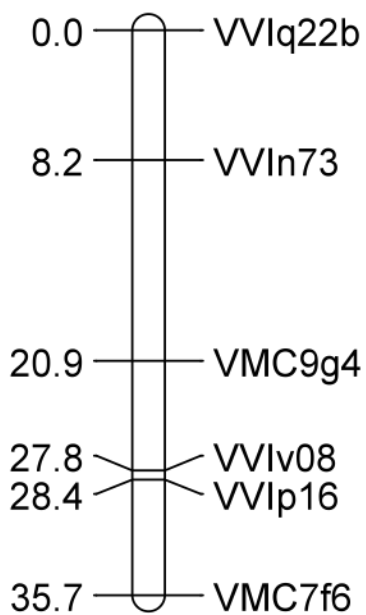
*M. rotundifolia* GL15



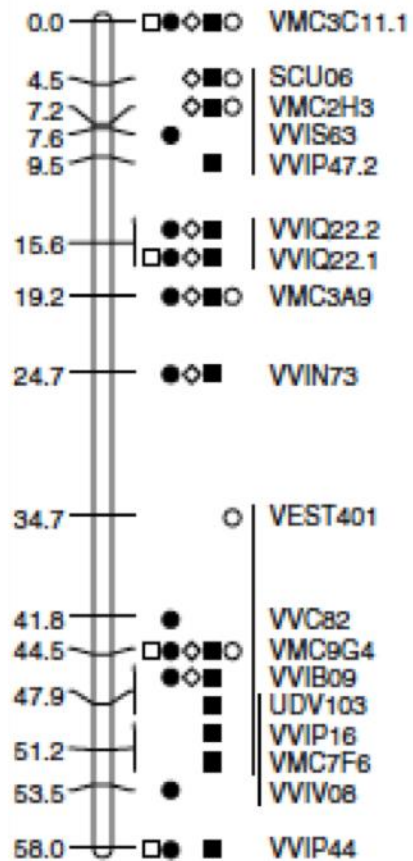
*V. vinifera* GL15



*M. rotundifolia* GL17

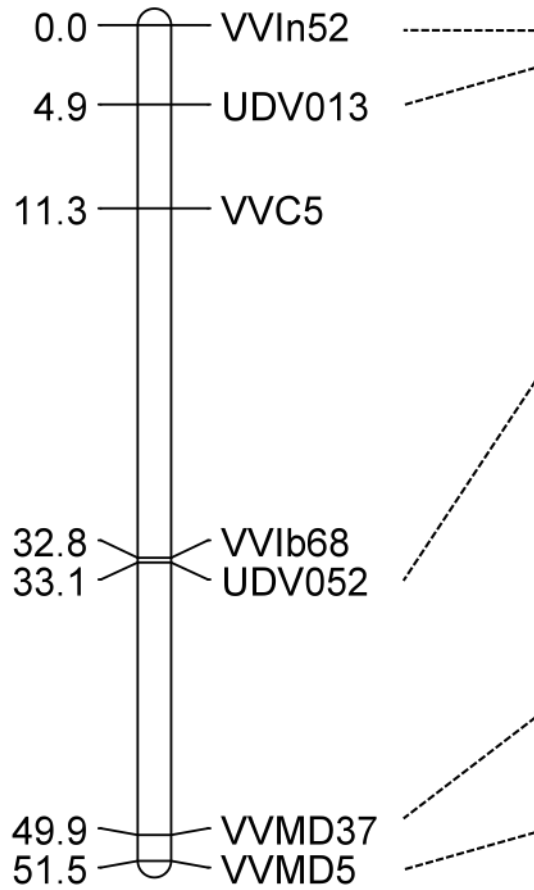


*V. vinifera* GL17

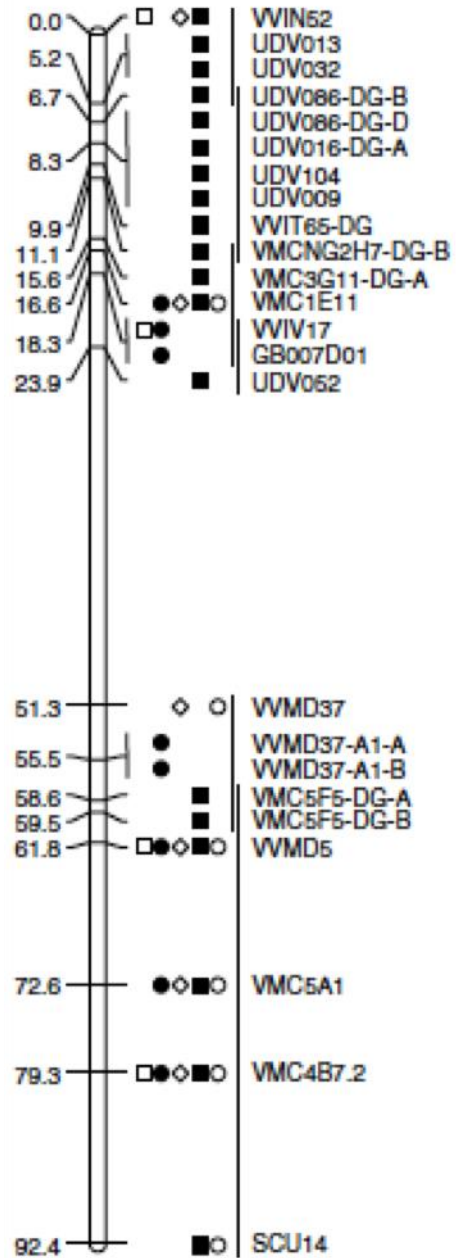




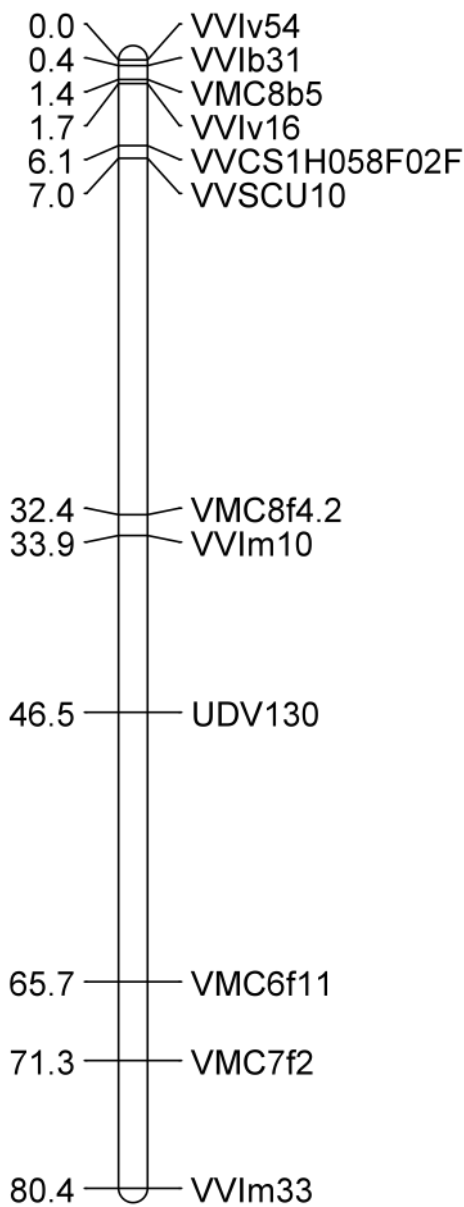
*M. rotundifolia* GL16



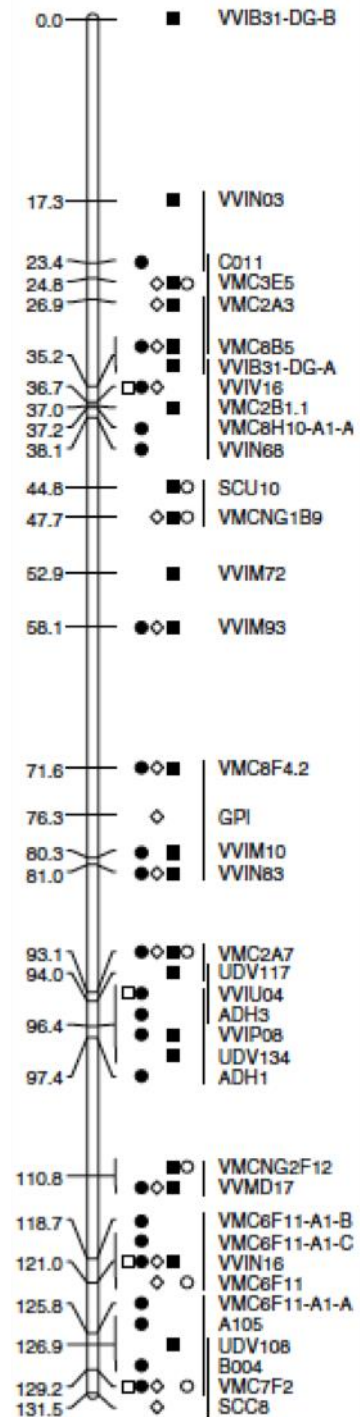
*V. vinifera* GL16



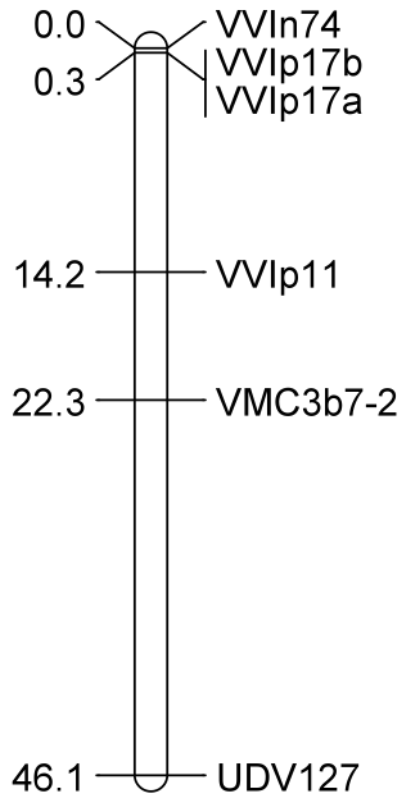
*M. rotundifolia* GL18



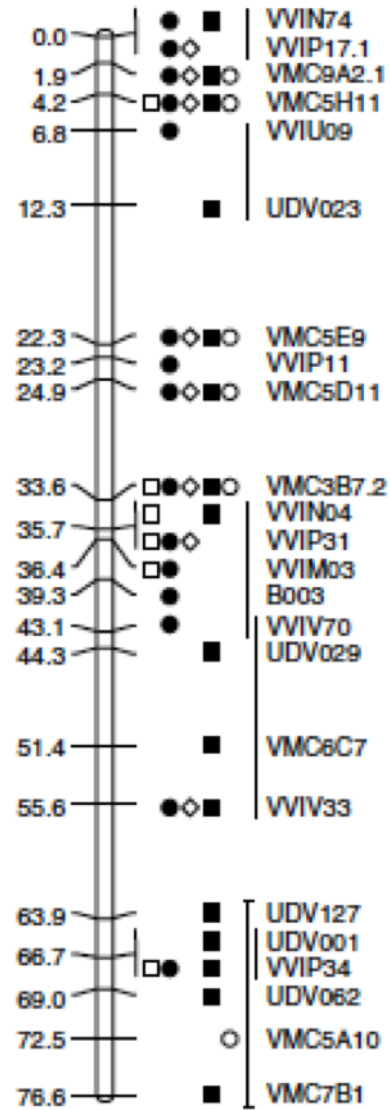
*V. vinifera* GL18



*M. rotundifolia* GL19



*V. vinifera* GL19



**Annexe 2 : Blanc *et al.*, Theoretical and Applied Genetics (2012)**

Theor Appl Genet  
DOI 10.1007/s00122-012-1942-3

ORIGINAL PAPER

## A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of *Ren5*, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew

Sophie Blanc · Sabine Wiedemann-Merdinoglu · Vincent Dumas · Pere Mestre · Didier Merdinoglu

Received: 16 March 2012 / Accepted: 15 July 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** *Muscadinia rotundifolia*, a species closely related to cultivated grapevine *Vitis vinifera*, is a major source of resistance to grapevine downy and powdery mildew, two major threats to cultivated traditional cultivars of *V. vinifera* respectively caused by the oomycete *Plasmopara viticola* and the ascomycete *Erysiphe necator*. The aim of the present work was to develop a reference genetic linkage map based on simple sequence repeat (SSR) markers for *M. rotundifolia*. This map was created using S1 *M. rotundifolia* cv. Regale progeny, and covers 948 cM on 20 linkage groups, which corresponds to the expected chromosome number for muscadine. The comparison of the genetic maps of *V. vinifera* and *M. rotundifolia* revealed a high macrosynteny between the genomes of both species. The S1 progeny was used to assess the general level of resistance of *M. rotundifolia* to *P. viticola* and *E. necator*, by scoring different parameters of pathogen development. A quantitative trait locus (QTL) analysis allowed us to highlight a major QTL on linkage group 14 controlling resistance to powdery mildew, which explained

up to 58 % of the total phenotypic variance. This QTL was named ‘Resistance to *Erysiphe Necator 5*’ (*Ren5*). A microscopic evaluation *E. necator* mycelium development on resistant and susceptible genotypes of the S1 progeny showed that *Ren5* exerts its action after the formation of the first appressorium, and acts by delaying, and then stopping, mycelium development.

### Introduction

Grapevine is an economically important crop worldwide, and it has a central place in the cultural heritage of humanity. The common muscadine grape, *Muscadinia rotundifolia* [Michx.] Small (Weaver 1976; Bouquet 1980; Olmo 1986; Mullins et al. 1992), is closely related to *Vitis* species, to the point of being also referred to as *Vitis rotundifolia* [Michx.]. Indeed, there is much taxonomic controversy as to whether *Muscadinia* should be considered as a proper genus, or should be placed within *Vitis*. Small’s (1913) classification will be used in this paper, considering *Muscadinia* as a genus. Muscadine grape is native to the southern United States of America, where it has been cultivated for more than 400 years, playing an important role in the history and sociology of this area. Although introduced in Europe in the late 19th century with most of the other American *Vitis* species, *M. rotundifolia* has not elicited any real interest from European growers, since the few attempts at cultivating it conducted at this time all failed (Bouquet 1983). From a genetic point of view the diploid chromosome number in *Muscadinia* species is 40 ( $2n = 40$ ) in contrast to 38 ( $2n = 38$ ) in *Vitis* grapes (Patel and Olmo 1955). Many morphological, anatomical and physiological characteristics also differ between *Vitis* and *Muscadinia*. Muscadine fruit has a

Communicated by D. Mather.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00122-012-1942-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Blanc · S. Wiedemann-Merdinoglu · V. Dumas · P. Mestre · D. Merdinoglu (✉)  
Santé de la Vigne et Qualité du Vin, INRA-UDS, UMR 1131,  
28 rue de Herrlisheim, BP 20507, 68021 Colmar Cedex, France  
e-mail: didier.merdinoglu@colmar.inra.fr

S. Blanc · S. Wiedemann-Merdinoglu · V. Dumas · P. Mestre · D. Merdinoglu  
Santé de la Vigne et Qualité du Vin, Université de Strasbourg,  
UMR 1131, 68021 Colmar, France

Published online: 03 August 2012

 Springer

distinctive aroma and flavor, the juice being sweet in taste and typically low in acidity (Olien 1990). Muscadine grapes have a high degree of resistance to diseases that commonly occur on bunch grapes, including grey mold, anthracnose, nematodes, Pierce's disease, and downy and powdery mildews (Olien 1990).

Downy mildew caused by the Oomycete *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.) Berl. and de Toni (Dick 2002), and powdery mildew caused by the ascomycete *Erysiphe necator* (Schw.) Burr. (synonym *Uncinula necator*) are two important grapevine diseases. *Plasmopara viticola* and *E. necator* were introduced in France from North America during the 19th century together with accessions of American wild *Vitis* species and rapidly spread across Europe (Galet 1977). Today, they are found in all of the temperate regions where grapevines are cultivated. *Plasmopara viticola* and *E. necator* are both obligate biotrophs infecting all green tissues of the grapevine. *Plasmopara viticola* infects leaves, inflorescences and young bunches, leading to significant losses of productivity and quality (Lafon and Clerjeau 1988). *Erysiphe necator* produces whitish mycelia on the surface of leaves, stems, inflorescences and berries. Affected berries become russeted and often crack, causing significant reduction in yield and fruit quality. Grape powdery mildew epidemics can progress rapidly and cause serious economic losses (Pool et al. 1984; Gadoury et al. 2001; Calonnet et al. 2004).

In Europe, *Vitis vinifera* is the most widely cultivated grapevine species. All the traditional cultivars of *V. vinifera* are susceptible to downy and powdery mildew, although susceptibility varies among cultivars (Boubals 1959; Dubos 2002). Control of downy and powdery mildews on traditional European grapevine varieties requires regular application of chemicals, and growers tend nowadays to limit risk of epidemics by applying large amounts of fungicides. However, routine use of fungicides is becoming increasingly restrictive because of their cost, risk on human health and negative environmental impacts. Furthermore, fungicide-resistant strains of *P. viticola* and *E. necator* are now observed in the vineyard, decreasing the efficiency of these sprays (Gisi 2002; Wilcox et al. 2003; Chen et al. 2007; Gisi et al. 2007; Gisi and Sierotzki 2008; Baudoin et al. 2008; Furuya et al. 2010).

In this context, plant breeding for disease resistance appears to be an attractive way to control grapevine downy and powdery mildew effectively and in an environmentally friendly manner. Because of its high level of resistance to numerous grapevine pathogens, *M. rotundifolia* is an interesting source in which to study resistance factors. Accordingly, QTLs (quantitative trait loci) for downy and powdery mildew resistance have been identified from muscadine grape: *Rpv1* and *Rpv2*, located respectively on chromosomes 12 and 18, were found to be responsible for

the resistance to downy mildew derived from *M. rotundifolia* cv. Trayshed (Merdinoglu et al. 2003; Wiedemann-Merdinoglu et al. 2006). A major QTL located on chromosome 12 and named *Run1*, was responsible for the resistance to powdery mildew derived from *M. rotundifolia* accession G52 (Pauquet et al. 2001; Barker et al. 2005). Recently, Riaz et al. (2011) identified on chromosome 18 two loci, named *Run2.1* and *Run2.2*, conferring resistance to powdery mildew from *M. rotundifolia* cv. Magnolia and *M. rotundifolia* cv. Trayshed, respectively. However, introgressing these resistance factors into traditional cultivated European species is challenging. On the one hand, hybridisation between *M. rotundifolia* and *V. vinifera* species is hampered by the difference in chromosome number between the *Vitis* and *Muscadinia* genomes (Bouquet 1983), which often brings along sterility problems in F1 hybrids and backcross generations, thus restricting interchange of genetic material between the two genera. On the other hand, the process of introgression of a resistance gene often results in the linkage drag of undesired traits from *M. rotundifolia* that may remain even after successive cycles of backcrossing.

Having a better understanding of the genetic and genomic differences between *M. rotundifolia* and *V. vinifera* becomes a central issue, in order to create new resistant grape varieties in an optimal way. Over the past decade, a large amount of molecular genetic information has become available to the grape research community for the genus *Vitis*, including genetic maps from a wide range of backgrounds (Dalbó et al. 2000; Doligez et al. 2002; Grando et al. 2003; Doucleff et al. 2004; Adam-Blondon et al. 2004; Riaz et al. 2004; Fischer et al. 2004; Doligez et al. 2006; Lowe and Walker 2006; Welter et al. 2007; Di Gaspero et al. 2007; Troggo et al. 2007; Salmaso et al. 2008; Marguerit et al. 2009; Bellin et al. 2009; Moreira et al. 2010; Blasi et al. 2011), physical maps (Moroldo et al. 2008), and a completed grape genome sequence (Jaillon et al. 2007; Velasco et al. 2007). However, very little genetic information is available for *M. rotundifolia*. The lack of genetic studies concerning *M. rotundifolia* and the absence of a genetic map for this species limit considerably the opportunities to increase the efficiency of breeding programs by means of marker-assisted selection. It also restricts the exploitation of the resource provided by the genome sequence of *V. vinifera* (Jaillon et al. 2007) to understand the genetic and physiological bases of the traits of interest carried by *M. rotundifolia*.

Here, we report the construction of a *M. rotundifolia* genetic map using simple sequence repeat (SSR) markers and the identification of a major QTL for resistance to grapevine powdery, named *Ren5* and located on linkage group (LG) 14. Twenty LGs have been found for *M. rotundifolia*, which corresponds to the expected chromosome



number. The comparison of the genetic maps of *V. vinifera* and *M. rotundifolia* showed a high colinearity between the genomes of both species. These main results reported here will allow a more efficient use of the *Muscadinia* resources for the creation of high-quality grapevine resistant varieties.

## Materials and methods

### Plant material

In 2006, 669 seeds were produced from a selfing (S1) of *M. rotundifolia* cv. Regale, a hermaphrodite accession maintained at INRA Colmar, France. After seed germination, young plants were cultivated in stone wool substrate, and watered daily with a complete nutritive solution (4.8 % Norsk Hydro Hydrokani CPO, YARA). The mapping population consisting of 191 progeny from this selfing was maintained in greenhouse. Biological replicates between years were produced by pruning the plants to the basal two buds in winter and allowing them to re-grow in spring to ensure uniform shoot development.

*V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon clone 338, *V. vinifera* cv. Cinsault, *V. rupestris* cv. Rupestris du Lot, *V. riparia* cv. Riparia Gloire de Montpellier and *M. rotundifolia* cv. Regale were grown from green cuttings and maintained in greenhouse.

### Evaluation of resistance to downy mildew

A strain of *P. viticola* collected from *V. vinifera* cv. Chardonnay in an experimental vineyard at INRA-Colmar (France) in 2006 was maintained on 6-week-old seedlings of *V. vinifera* cv. Muscat Ottonel placed in an opened cardboard box covered with a plastic bag. After 5 days of incubation in a growth chamber (21 °C, 100 % relative humidity, 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  light intensity), sporangia were recovered from infected leaves by immersion in water and gentle shaking. The concentration of the *P. viticola* suspension was measured using a cell-counting chamber.

Evaluation was performed as described in Blasi et al. (2011). Two replicates were performed for each individual of the S1 population and nine replicates for each control. On 6 days post-inoculation (dpi), inoculated leaf discs were scored for the general level of resistance (OIV452) (Table 1). Two biological replicates were performed in 2009 and 2010, mean values of the two repetitions were considered in the analysis.

### Evaluation of resistance to powdery mildew

The experiments were performed with a strain of *E. necator*, Chlo2b (biotype B) collected from *V. vinifera* cv.

Merlot Noir at Pauillac (Gironde, France) in 2004 and maintained on detached juvenile leaves of greenhouse-grown seedlings from open pollination of 'Muscat Ottonel' or 'Cinsault'.

Inoculation was performed as described in Miclot et al. (2012), inside a vertical laminar flow station using dry inoculation with a settling tower. Four culture dishes were inoculated for each settling tower, containing one susceptible control ('Cabernet Sauvignon 338' or 'Cinsault') and one resistant control ('Regale'). Two replicates were performed for each genotype of the S1 population. Dishes were then sealed and incubated in a growth chamber at 25 °C and a photoperiod of 18-h light/6-h darkness. Inoculated leaves were scored everyday, 3–7 dpi, for the two semi-quantitative parameters described in Table 1 to measure the effect of resistance on the mycelium development of *E. necator* (MYC) and the intensity of sporulation (SPO), as described by Miclot et al. (2012). The 7 dpi scores gave the more discriminating results and were therefore the only time point considered in further analysis. Mean values of two biological replicates performed in 2010 and 2011 were considered in this study.

### SSR marker analysis

DNA extractions and microsatellite analysis were performed as described in Blasi et al. (2011), with the following modifications. Amplifications were performed on a Perkin Elmer 9700 thermocycler programmed as follows: 5 min at 94 °C, 14 cycles of 20 s at 94 °C, 20 s at 65 °C with a touchdown (−1 °C per cycle) and 40 s at 72 °C, followed by 35 cycles of 20 s at 94 °C, 20 s at 50 °C and 40 s at 72 °C, and a final step of 7 min at 72 °C. Microsatellite fragments were resolved either on an automated ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using a 36-cm capillary filled with the POP-4 polymer, or on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using 16 × 50 cm capillaries filled with the POP-7 polymer. Electropherograms were analyzed using Genescan™ 3.1 (Applied Biosystems). Alleles were identified using Genotyper™ 2.5.2 (Applied Biosystems) and their size was determined using the HD400-ROX internal size standard.

### Genetic mapping

We used 451 primer pairs flanking microsatellite loci from marker sets VVS (Thomas and Scott. 1993), VVMD (Bowers et al. 1996, 1999), VrZAG (Sefc et al. 1999), VMC (Vitis Microsatellite Consortium, Agrogene, Moissy Cramayel, France), UDV (Di Gaspero et al. 2005), VVI (Merdinoglu et al. 2005), VrG (Regner et al. 2006), VVCS and SC8 (Cipriani et al. 2011), P2-298 (Pelsy, personal

**Table 1** Variables scored to assess the resistance level to downy and powdery mildew

Pathogen	Variable name	Description	Scoring
Downy mildew	OIV452	Symptom-based semi-quantitative scoring of the downy mildew resistance adapted from the criteria of the Office International de la Vigne et du Vin (OIV; Anonymous 2009) <a href="http://news.reseau-concept.net/images/oiv/client/Code_descripteurs_2ed_FR.pdf">http://news.reseau-concept.net/images/oiv/client/Code_descripteurs_2ed_FR.pdf</a>	From 1 (very susceptible) to 9 (totally resistant): 1 = abundant sporulation densely covering the whole disc area, absence of plant necrosis 3 = abundant sporulation present in large patches, absence of plant necrosis 5 = limited sporulation present in intercostal patches, plant necrotic flecks or speckles 7 = sparse sporulation, necrotic spots 9 = no sporulation, absence of necrosis or necrotic points
Powdery mildew	MYC	Visual semi-quantitative scoring of mycelium development on leaf surface	From 1 (very susceptible) to 9 (totally resistant): 1 = widespread mycelium densely covering the whole disc area 3 = widespread and locally dense mycelium 5 = widespread and sparse mycelium 7 = scattered and sparse mycelium 8 = rare and very short mycelium hyphae 9 = absence of mycelium development
Powdery mildew	SPO	Visual semi-quantitative scoring of sporulation intensity	From 1 (very susceptible) to 9 (totally resistant): 1 = widespread sporulation with high density of conidiophores 3 = widespread with various density of sporulation 5 = scattered with various density of sporulation 7 = scattered with low density of conidiophores 8 = rare conidiophores 9 = absence of sporulation

communication), Chr7V003, Chr7V004 and Chr14V015 (Blasi et al. 2011) and the newly developed Chr14V041, Chr14V048, Chr14V054, Chr14V056 (Table S1).

All markers were screened for informative segregation on the parent *M. rotundifolia* and 8–12 randomly chosen individuals of the S1 population. One hundred and seventy-seven polymorphic SSR markers were used to analyze the entire mapping population. For mapping purposes, the same segregation pattern was assigned to all markers (<hkxhk>: locus heterozygous in both parents, two alleles), and genotypes were encoded (hh,hk,kk) for co-dominant loci and (h-,kk) for dominant loci, following JoinMap 3.0 data entry notation (Van Ooijen and Voorrips 2001).

Linkage analysis was performed with JoinMap 3.0 (Van Ooijen and Voorrips 2001), enabling the analysis of self-pollinated populations derived from a heterozygous parent and the construction of consensus linkage maps. Recombination fractions were converted into centimorgans (cM) using the Kosambi (1944) function. The threshold value of the logarithm of odds (LOD) score was set at 4.0 to claim linkage between markers with a maximum fraction of recombination at 0.45. The goodness-of-fit between

observed and expected Mendelian ratios was analyzed for each marker locus using a  $\chi^2$  test. Markers showing segregation distortion were included in the final map if their presence did not alter surrounding marker order on the linkage group. Linkage groups were numbered according to internationally acknowledged grapevine reference genetic maps (Doligez et al. 2006; Di Gaspero et al. 2007).

#### QTL analysis

The genetic variance ( $\sigma_g^2$ ) and experimental error variance ( $\sigma_e^2$ ) required for heritability calculations were estimated using the statistical software R version 2.10.1 (The R Foundation for Statistical Computing) in the lmer function of the package lme4 by treating genotype as a random factor. Broad-sense heritability estimates were calculated on a genotype mean basis via the equation  $H^2 = s_g^2 / (s_g^2 + (s_e^2/r))$  (Gallais 1990), where the term  $r$  refers to the number of replicates for each genotype.

QTL analysis was carried out using MapQTL 6.0 software (Van Ooijen 2009). The significant LOD threshold for QTL detection at  $P = 0.05$  for each linkage group was

determined by three independent permutation tests (1,000 permutations) of the phenotypic data. Non-parametric Kruskal–Wallis analysis and interval mapping (Mixture Model method) were performed on OIV452, MYC and SPO parameters. Maximum LOD values were used to estimate QTL peak positions, and the confidence intervals of QTL peaks were determined as the peak flanking regions in which LOD scores declined by two LODs. A manual cofactor selection was then used in Multiple QTL Model (MQM) analysis for powdery mildew phenotypic data.

#### Scanning electron microscopy

Observations were performed on a Hitachi TM1000 tabletop scanning electron microscope, with a 15-kV acceleration tension and a Backscattered Electron Detector. Samples correspond to 1-cm discs generated from leaves inoculated with the Chlo2b strain of *E. necator* using a settling tower. Resistant and susceptible genotypes of the S1 ‘Regale’ population were inoculated with *E. necator* and observed 4 hpi (hours post-inoculation), 1 dpi and 2 dpi. Three genotypes were observed per class of resistance level.

## Results

### *Muscadinia rotundifolia* genetic map

451 SSR primer pairs were tested on the S1 population, from which 77 did not amplify or produced an unclear banding pattern, and 197 lacked polymorphism and were thus discarded. The remaining 177 primer pairs allowed us to detect 181 useful loci scored on the progeny, 145 being fully informative (hh,hk,kk) and 36 displaying a dominant pattern (h-, kk). Chi-square analysis among the 181 mapped markers indicated segregation distortion for 33 markers (22.3 %).

One hundred seventy-eight markers were mapped on 20 LGs (Fig. 1), and three markers were linked but unmapped due to weak linkages to other markers within the group. The observed linkage group number is consistent with the chromosome number in the *Muscadinia* genus (Bouquet 1983; Patel and Olmo 1955). Based on the latest published *V. vinifera* reference map (Doligez et al. 2006), LG20 of *M. rotundifolia* corresponds to the bottom part of *V. vinifera* LG7 (Fig. 2).

The total length of the map was 948 cM, with an average distance of 5.3 cM between markers. The largest group in terms of genetic distance, LG18, consisted of 12 mapped markers covering 80.4 cM, and the smallest, LG9, consisted of 10 mapped markers covering 11.8 cM. In terms of marker coverage, the largest group is LG14,

including 16 markers, and the smallest is LG8, consisting of 5 markers. Overall, only 9 gaps were larger than 20 cM. The largest gap was on LG14, where the distance between marker VVC34 and VVi70 was 35 cM. The marker order was consistent with the order determined from the *V. vinifera* genome sequence (Jaillon et al. 2007; <http://www.genoscope.cns.fr/spip/Vitis-vinifera-sequencage.html>) as well as with the *V. vinifera* reference maps (Adam-Blondon et al. 2004; Doligez et al. 2006), although in two genomic regions marker order was not syntenic in comparison to the reference maps [(LG6: ‘VVi28 to VVi43’); (LG12: ‘VMC4c10 to VVi05’)]. In these regions, little discrepancies in marker order are observed punctually, in particular for the positioning of VMC4g6 on LG6 and VVi11 on LG12. Finally, some markers showed a multilocus pattern, and either they were located on several chromosomes or they mapped to chromosomes different from expected (VVi61, VVi19, VMCNG1d12, VVi02 and VVCS1E043E23F1-1).

The *M. rotundifolia* map covers 56 % on average in genetic distance, compared to the reference map of Doligez et al. (2006). Nevertheless, the genetic distance ratio obtained using the common distal markers to align both maps is 70 %, suggesting that the recombination rate is, on average, much lower in the *M. rotundifolia* map than in the reference map (Table 2). Taking into account the lower recombination rate, the overall coverage of the map is estimated at 80 %.

### Analysis of downy mildew resistance

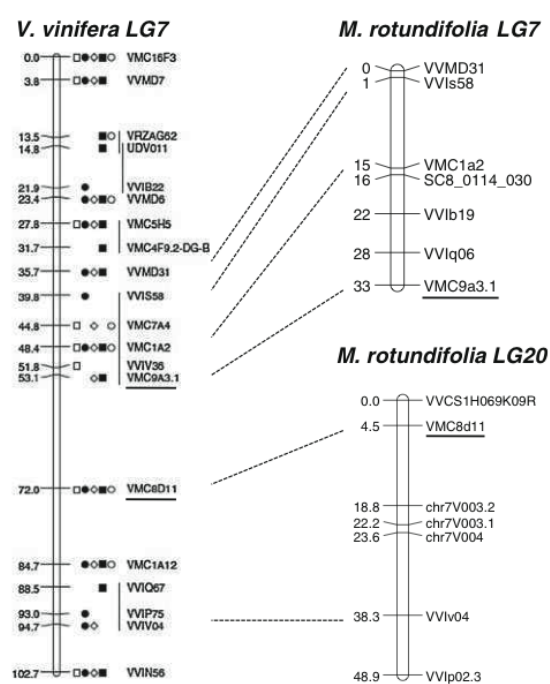
The reliability of the downy mildew resistance test was assessed by scoring the OIV452 resistance parameter in control plants that represent a range of resistance levels from susceptible to highly resistant : ‘Cabernet Sauvignon 338’ (susceptible), ‘Rupestris du Lot’ and ‘Riparia Gloire de Montpellier’ (both partially resistant) and ‘Regale’ (the totally resistant parent of the S1 mapping population). All control plants as well as the parent of the S1 population behaved as expected for their level of resistance evaluated in this study (Table S2).

Resistance to downy mildew displayed little variation in the S1 population, which exhibits overall strong resistance to the pathogen. The distribution for OIV452 in the S1 population ranged from 7.0 to 9.0, the most susceptible individuals displaying strong partial resistance, whereas the most resistant were totally resistant, like the ‘Regale’ parent. More than 90 % of the individuals were totally resistant (OIV9), whereas the remaining part of the population showed strong partial resistance (Fig. 3a).

In the S1 population, the genotype factor had a highly significant ( $P < 0.001$ ) effect on OIV452 scores. Broad-sense heritability, a direct measure of environmental







**Fig. 2** Macrosyntentic comparison between *V. vinifera* LG7 and *M. rotundifolia* LG7 and LG20. All the markers located on *M. rotundifolia* LG20 are located on *V. vinifera* LG7 in the same genetic order. VMC9a3.1 and VMC8d11 (*underlined*) are separated by 18.9 cM on the *V. vinifera* reference map, but in the *M. rotundifolia* map they are located respectively the bottom extremity of LG7 and the upper part of LG20. Dotted lines link common markers between the two genetic maps. *Vitis vinifera* LG7 as in the reference map of Doligez et al. (2006)

19.2 cM, and it was placed between the SSR markers UDV130 and VMC6f11 (closer to VMC6f11) (Table 4).

#### QTL detection for powdery mildew resistance

Significant QTLs for powdery mildew resistance were obtained by interval mapping analysis, regarding mycelium development (MYC) and sporulation (SPO) of the pathogen (Table 4). A major QTL controlling resistance to powdery mildew was detected on LG14 for MYC and SPO. Analysis based on MYC gave the highest LOD score (23.73) and explained 58 % of the total phenotypic variance and thus nearly 80 % of the genetic variance, considering the broad sense heritability estimated at 73 %. The same region accounted for 11.4 % of the phenotypic variation (LOD score of 3.31) for SPO, and thus 22 % of the genetic variance, considering the broad sense heritability estimated at 52 %. The confidence interval for the QTL detected for MYC was located between the markers VViIp05 and Chr14V041 and the QTL peak was close to

SSR marker VMC9c1 (Table 4, Fig. 4a). Kruskal–Wallis non-parametric tests confirmed these QTLs detected with interval mapping ( $P < 0.0001$ , data not shown). The locus at this position was named ‘Resistance to *Erysiphe necator* 5’ (*Ren5*). The genome region between the markers flanking the *Ren5* confidence interval covers a physical distance of 3.08 Mb and encompasses around 150 genes, according to the 12× grape genome sequence (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>).

A minor QTL was detected on LG20 for SPO (LOD 2.52) very close to VMC8d11 (Table 4). This QTL remained above the LOD threshold given by permutation test analysis (data not shown), and VMC8d11 achieved a fair statistical linkage to the disease QTL using Kruskal–Wallis test ( $P < 0.01$ ).

Choosing VMC9c1 and UDV 050 as cofactors for further analysis with composite interval mapping (MQM mapping), the sporulation specific QTL on LG20 remained over the LOD threshold. Interestingly, a new minor QTL appeared on LG5 close to VViV21 for both MYC and SPO (LOD 5.12 and 2.72), explaining 8.1 and 8.4 % of the phenotypic variation, respectively, thus 11.1 and 16.2 % of the genetic variance, considering the respective broad sense heritabilities (Table 4). All the QTL detected were found with the two biological replicates taken separately (data not shown).

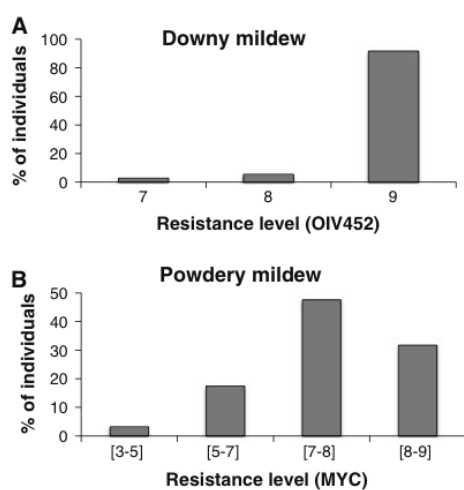
#### Microscopic evaluation of the effect of *Ren5* on *E. necator* mycelium development

The marker VMC9c1 is the closest marker to *Ren5*. At this genetic locus, the allelic form 132 is associated with the resistance, whereas the allelic form 146 is associated with susceptibility. As shown in Fig. 4b, the distribution of MYC notations varies in groups of individuals based on their genotype at locus VMC9c1, with all homozygous 132/132 (resistant) individuals having a MYC score above 7, whilst the majority of homozygous 146/146 (susceptible) individuals show a MYC score of 7 or below. Heterozygous individuals show a wider distribution of MYC score and appear intermediate between the other two classes.

Scanning electron microscopy experiments were conducted to visualize the effect of *Ren5* on the early stages of *E. necator* mycelium development. Resistant (132/132 form of VMC9c1) and susceptible (146/146 form of VMC9c1) genotypes were inoculated with *E. necator*. Four hpi, both genotypes supported development of the first appressorium from the germinated conidia (Fig. 5), which corresponds to normal pathogen development, as described in Rumbolz et al. (2000). The presence of the appressorium structure is linked to the subsequent formation of a haustorium, which represents the first stage of the biotrophic phase of the fungus. Differences in mycelium growth

**Table 2** Comparison of the genome coverage and genetic distances between *V. vinifera* reference linkage map (Doligez et al. 2006) and *M. rotundifolia* genetic linkage map

Linkage group	Markers common between maps		Genetic distance between common markers			Maximum genetic distance		
	Start marker	End marker	Reference map	<i>M. rotundifolia</i> map	Ratio	Reference map	<i>M. rotundifolia</i> map	Ratio
1	VVIq35	VVIo61	69.2	53.7	0.78	87.5	53.7	0.61
2	VVMD34	P2-298	48.2	29.6	0.61	79.7	33.5	0.42
3	UDV093	VMC1g7	45.2	32.1	0.71	70.3	49.7	0.71
4	VVIr46	VMC6g10	87.9	67.0	0.76	90.9	67.0	0.74
5	VVC6	VVIn40	79	49.8	0.63	83.4	49.8	0.60
6	UDV085	VVIm43	57.9	38.0	0.66	82.5	38.0	0.46
7	VVMD31	VMC9a3.1	17.4	32.8	1.89	102.7	32.8	0.32
8	VMC1f10	VVIb66	87	54.8	0.63	112.7	54.8	0.49
9	VMC5c1	VMC6e4	60.6	9.8	0.16	104.1	11.8	0.11
10	UDV073	VVIv37	56.7	35.0	0.62	83.7	43.3	0.52
11	VVIm04	VVIv35	64.5	47.0	0.73	75.1	47.0	0.63
12	TT251F02	VVIb10	72.9	42.1	0.58	81.9	49.7	0.61
13	VVIn62	VMCNG1d12.1	92.4	56	0.61	101.1	56.0	0.55
14	VMCNG1e1	VVIn70	94.8	64.0	0.68	94.8	64.0	0.67
15	VVIv67	VMC4d9.2	32.4	21.9	0.68	37.9	34.5	0.91
16	VVIn52	VVMD5	61.8	51.5	0.83	92.4	51.5	0.56
17	VVIq22b	VMC7f6	35.6	35.7	1.00	58	35.7	0.62
18	VVIb31	VMC7f2	94	70.9	0.75	131.5	80.4	0.61
19	VVIn74	UDV127	63.9	46.1	0.65	76.6	46.1	0.60
20	VMC8d11	VVIv04	22.7	33.8	1.49	–	48.9	–
Total			1,244.1	871.6	0.70	1,646.8	948.2	0.56

**Fig. 3** Distribution of parameters for downy and powdery mildew resistance in the *M. rotundifolia* S1 population. Percentage of genotypes in the S1 *M. rotundifolia* cv. Regale population in each level of resistance for (a) downy mildew, using the OIV 452 parameter at 6 dpi. (b) powdery mildew, using the MYC parameter at 7 dpi. Individuals were classified in the different classes based on the mean value of two biological repetitions

between resistant and susceptible genotypes are visible 1 dpi; while resistant genotypes are still blocked at the first appressorium stage, primary and secondary hyphae begin to grow on susceptible genotypes. Two dpi, only primary hyphae are seen on resistant genotypes, while branched mycelium is observed on susceptible genotypes. The susceptible genotypes of the S1 population show less pathogen development than 'Cabernet Sauvignon 338', which is consistent with the macroscopic observations.

## Discussion

Here, we report the first *M. rotundifolia* genetic linkage map, based on an intra-specific progeny and using SSR markers. Since SSR are easily transferable markers, there is a high level of reproducibility and polymorphism of *V. vinifera*-based SSR markers in non-*vinifera* species, even in a *M. rotundifolia* background. More than 80 % of the SSR markers tested on the S1 mapping population that were originally designed on *V. vinifera* amplified perfectly on *M. rotundifolia* DNA. The grape SSR marker system has been further used to manage *M. rotundifolia*



germplasm collections (Riaz et al. 2008) and our study confirms that it is a highly valuable genomic tool. The proportion of SSR markers with biased segregation observed in this study (22.3 %) was higher than that reported by Doligez et al. (2006) (9.2 %), Blasi et al. (2011) (11.3 %), Lowe and Walker (2006) (16 %) and Troggo et al. (2007) (20.3 %), and slightly equivalent than that of Grando et al. (2003) (22.4 %). Three clusters of

markers with a distortion of segregation were found on LG6 (11 markers), LG8 and LG19 (6 markers each). The development of the new SSR markers Chr14V041, Chr14V048, Chr14V054 and Chr14V056 from the 12× grapevine genome sequence permitted the improvement of the construction of LG14, and especially enabled a more accurate detection and location of *Ren5*. Finally, 15 SSR markers (VVIr06, UDV054, VVIq25, VVIu16, VrG4, VVIm58, VVIq06, VVIv51, VMC5h4, VVIv47, VVIr29, VVC5, VVIb68, UDV130 and VVIm33), whose positions were unknown according to any previously published genetic linkage map, and the 12× grapevine genome sequence (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>), were accurately located in this study on 10 different LGs.

The *M. rotundifolia* genetic map was composed of 178 markers mapped into 20 LGs. The total length of the map was 948 cM. Considering marker order, linkage group sizes and map length, the *M. rotundifolia* map built in this work is consistent with other published maps (Adam-Blondon et al. 2004; Doligez et al. 2006) and with the genome sequence [(Jaillon et al. 2007); <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>].

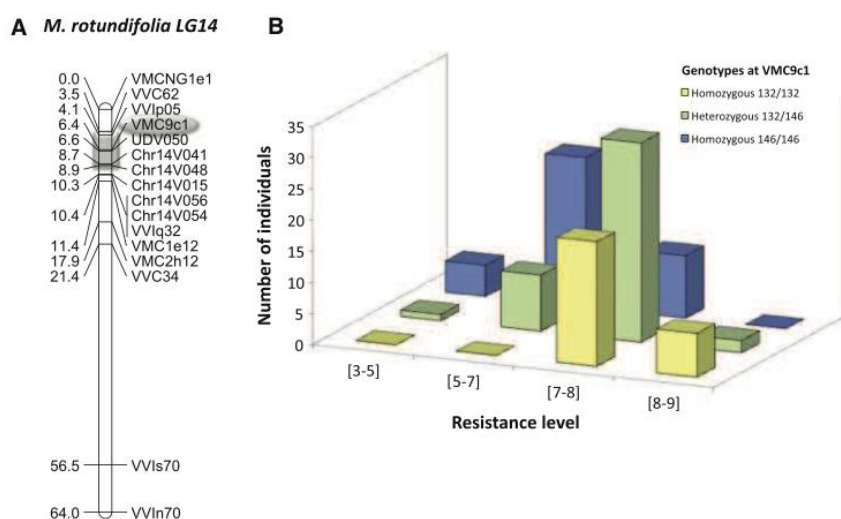
**Table 3** Descriptive statistical parameters for downy mildew and powdery mildew resistance parameters in the *M. rotundifolia* S1 population

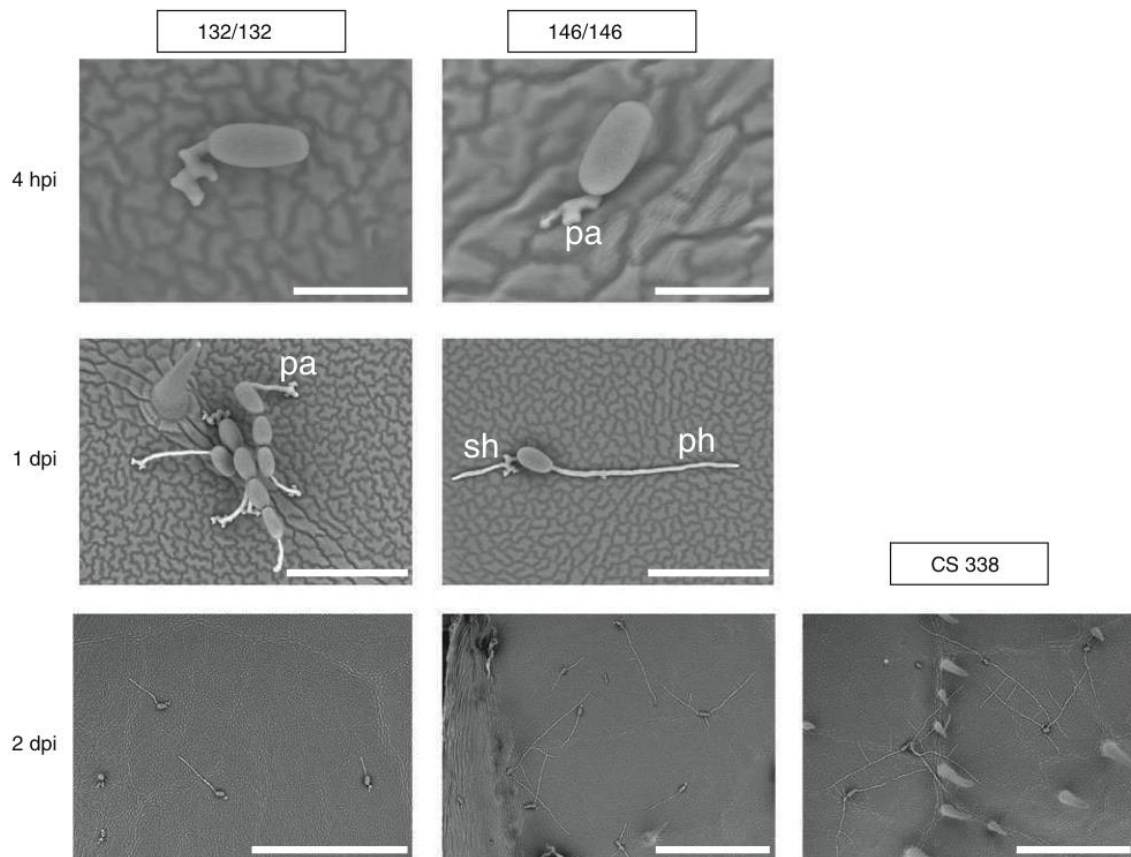
	Downy mildew		Powdery mildew	
	OIV452	MYC	MYC	SPO
Average	8.89	7.62	7.62	8.95
Minimum	7.0	3.50	3.50	7.50
Maximum	9.0	9	9	9
Standard deviation	0.39	0.94	0.94	0.21
Heritability	0.53	0.73	0.73	0.52

**Table 4** QTLs for resistance to *P. viticola* and *E. necator* detected in the *M. rotundifolia* S1 population

Pathogen	Trait	Linkage group	Nearest marker	Peak position	2-LOD interval	LOD score	Percentage of phenotypic variance explained	Trait heritability	Percentage of genotypic variance explained
Downy mildew	OIV	18	VMC6f11	55.5	47.5–65.5	6.06	24.7	0.53	46.6
Powdery mildew	MYC	14	VMC9c1	6.4	4.1–8.7	23.73	58	0.73	79.4
	MYC	5	VVIv21	31.7	21.7–44.8	5.12	8.1	0.73	11.1
	SPO	14	VMC9c1	6.4	0–21.4	3.31	11.4	0.52	21.9
	SPO	20	VMC8d11	0	0–23.6	2.52	8.8	0.52	16.9
	SPO	5	VVIv21	31.7	21.7–44.8	2.72	8.4	0.52	16.2

**Fig. 4** Distribution of powdery mildew resistance based on the genotype at the *Ren5* locus (a) *M. rotundifolia* LG14 and confidence interval for *Ren5* (grey box), the marker VMC9c1 being the most strongly associated with *Ren5*. (b) Yellow homozygous resistant genotypes (132/132 form of VMC9c1); green heterozygous genotypes (132/146 form of VMC9c1); blue homozygous susceptible genotypes (146/146 form of VMC9c1) (color figure online)





**Fig. 5** Electron microscopy images of resistant and susceptible genotypes of the S1 population inoculated with *E. necator*. Resistant (132/132 at VMC9c1) and susceptible (146/146 at VMC9c1) genotypes of the S1 *M. rotundifolia* cv. Regale population, inoculated with *E. necator* and observed 4 hpi, 1 dpi and 2 dpi with a scanning

electron microscope. Primary appressorium *pa*, primary hyphae *ph*, secondary hyphae *sh*. Data are representative of three independent genotypes per class. *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon clone 338 (CS 338) is used as susceptible control. Scale bars represent 30  $\mu$ m at 4 hpi, 100  $\mu$ m at 1 dpi and 500  $\mu$ m at 2 dpi

[cns.fr/externe/English/Projets/Projet\\_ML/index.html](http://cns.fr/externe/English/Projets/Projet_ML/index.html)] except for small discrepancies: two inversion sectors in marker order between the *M. rotundifolia* map and the reference maps, and a few cases where a marker was expected on a LG and was actually located on a different one due to multiloci alleles. One of the areas showing an altered marker order mapped to bottom part of LG12, in a region containing a large cluster of NBS-LRR genes, comprising *Rpv1* and *Run1*, two locus involved in downy and powdery mildew resistance in 'Trayshed' and 'G52'. NBS-LRR clusters are known to be subjected to frequent reshuffling and recombination events. The clustered organization is supposed to favor sequence exchanges, such as unequal crossing over and/or gene conversion events, which can give rise, in some cases, to new (nonparental) R specificities (Sudupak et al. 1993; Richter et al. 1995; Chin et al. 2001; Geffroy et al. 2009). Nevertheless, the high

colinearity between the *M. rotundifolia* map and the previously published *V. vinifera* maps reveals a high level of global macrosynteny between both genomes. This finding will greatly facilitate the exploitation of the resource provided by the whole genome sequence of *V. vinifera* (Jaillon et al. 2007) to understand the genetic and physiological bases of the traits of interest carried by *M. rotundifolia*. Moreover, this framework *M. rotundifolia* genetic map will help processing comparative genetic analysis, especially to establish synteny for the regions that carry disease resistance genes, and understand the evolution of genomes.

Recombination rate was, on average, much lower in the *M. rotundifolia* map than in the latest *V. vinifera* reference map (Doligez et al. 2006). Such a similar result was obtained by Blasi et al. (2011) for a *V. amurensis* genetic map which led to the conclusion of lower recombination rates in the Asiatic species than in *V. vinifera*.



The *V. vinifera* LG7 corresponds to two separated LGs in the *M. rotundifolia* map, LG7 and LG20. *M. rotundifolia* LG20 corresponding to the bottom part of *V. vinifera* LG7. The markers VMC9a3.1 and VMC8d11, which are located 18.9 cM from each other in the *V. vinifera* reference map, respectively represent the bottom extremity of *M. rotundifolia* LG7 and the upper part of *M. rotundifolia* LG20. Considering the fact that the recombination rate in *M. rotundifolia* is lower than in *V. vinifera* (Table 2), we can assume that this distance should be even smaller in *M. rotundifolia*. If LG7 and LG20 of *M. rotundifolia* were part of the same chromosome we would then expect to find them assembled on the *M. rotundifolia* map. Our results thus strongly suggest that *V. vinifera* LG7 is splitted in two chromosomes in *M. rotundifolia*. A genetic map more with greater saturation in the VMC9a3.1–VMC8d11 interval, or Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) experiments would help confirm this hypothesis.

QTL analysis demonstrated that downy mildew resistance derived from *M. rotundifolia* was determined by a QTL located on LG18 that explained nearly 46 % of the genetic variance. The confidence interval of the LG18 QTL for downy mildew resistance overlaps with *Rpv2* from ‘Trayshed’ (Wiedemann-Merdinoglu et al. 2006), which indicates that downy mildew resistance in muscadine grape cultivars Trayshed and Regale is at least partly governed by the same region on LG18. Nevertheless it is currently too premature to conclude that the same genetic factor is involved.

Resistance to powdery mildew displayed a continuous variation in the *M. rotundifolia* S1 population, where the most susceptible individuals displayed partial resistance. This suggests the existence of one or more homozygous non-segregating factors in the genetic background of ‘Regale’ that maintains residual resistance. Accordingly, QTL analysis demonstrated that powdery mildew resistance derived from *M. rotundifolia* was mainly determined by one major QTL located on LG14 that explained almost 80 % of the genetic variance for mycelium development. We named this locus *Ren5*, for *Resistance to Erysiphe necator* 5. This major QTL impacts on both mycelium development and sporulation intensity. A minor QTL detected on LG5 explaining up to 16 % of the genetic variation also plays a role in resistance. Moreover, a genetic factor specific to sporulation and located on the upper part of LG20 is involved in powdery mildew resistance in ‘Regale’. The strong effect of *Ren5* together with the high level of genome coverage of the linkage map leads us to assume that no significant genetic factor involved in powdery mildew resistance other than those detected in this study segregates in the S1 progeny. Microscopic observations suggest that *Ren5* exerts its action after the formation of the first appressorium and acts by delaying, and then stopping, mycelium development.

*Ren5* is located on the upper side of LG14, flanked by SSR markers VVIp05 and Chr14V041, on a genomic region never previously described to be controlling powdery mildew resistance in *M. rotundifolia* or in *Vitis* species. The locus *Run1* has been identified to control resistance to powdery mildew in ‘G52’ on LG12 (Pauquet et al. 2001; Barker et al. 2005), and recently Riaz et al. (2011) identified in *M. rotundifolia* cv. Magnolia and ‘Trayshed’ two loci for resistance to powdery mildew named respectively *Run2.1* and *Run2.2*, both mapping on LG18. These results indicate that resistance to powdery mildew from *M. rotundifolia* may have different locations according to which cultivar is made use of. The *Ren5* locus is located in the confidence interval of *Rpv8*, the major QTL of resistance to downy mildew identified from *V. amurensis* (Blasi et al. 2011). Based on the latest version of the grapevine genome sequence (12×, <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>), the region delimited by markers VVIp05 and Chr14V041 is 3 Mb in size and contains around 150 predicted genes, which means that it is a bit premature to speculate on a putative candidate for *Ren5* function. Nevertheless, inspection of this region on the 12× version of the grapevine genome sequence revealed the presence of at least 7 predicted NBS-LRR genes as well as *V. vinifera* EDR1 a regulator of defense responses (Frye et al. 2001). Thus, we cannot discard that *Ren5* is a member of the NBS-LRR class of disease resistance genes.

**Acknowledgments** Work funded by the French “Agence Nationale de Recherche” (ANR-08-GENM-007). We are grateful to E. Duchêne for useful discussions on statistical methods. We thank P. Coste and M.-A. Dorne for excellent technical assistance in plant growing and inoculum maintenance, V. Tharreau, N. Choisine and P. Blasi for providing primer sequences and M. Erhardt for assistance with scanning electron microscopy.

## References

- Adam-Blondon A-F, Roux C, Claux D, Butterlin G, Merdinoglu D, This P (2004) Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theor Appl Genet* 109:1017–1027
- Anonymous (2009) Descriptor list for grapevine varieties and *Vitis* species, 2nd edn. Office International de la Vigne et du Vin (OIV), Paris
- Barker CL, Donald T, Pauquet J, Ratnaparkhe MB, Bouquet A, Adam-Blondon A-F, Thomas MR, Dry I (2005) Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance-gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theor Appl Genet* 111:370–377
- Baudoin A, Olaya G, Delmotte F, Colcol JF, Sierotzki H (2008) QoI Resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the Mid-Atlantic United States. *Plant Manag Netw Plant Health Prog*. doi:10.1094/PHP-2008-0211-02-RS
- Bellin D, Peressotti E, Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Adam-Blondon A-F, Cipriani G et al (2009) Resistance to

- Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theor Appl Genet* 120:163–176
- Blasi P, Blanc S, Prado E, Rühl EH, Mestre P, Merdinoglu D (2011) Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theor Appl Genet* 123:43–53
- Boubals D (1959) Amélioration de la résistance de la vigne au mildiou (*Plasmopara viticola* (Berk et Curt.) Berlese et de Toni). Recherche de gènes de résistance. *Annales de l'amélioration des plantes* 6:481–525
- Bouquet A (1980) *Vitis* × *Muscadinia* hybridization: a new way in grape breeding for disease resistance in France. Proc 3rd Intl Symp On Grape Breeding, pp 177–197
- Bouquet A (1983) Contribution à l'étude de l'espèce *Muscadinia rotundifolia* (Michx) Small et de ses hybrides avec *Vitis vinifera* L.—applications en sélection. Dissertation, University of Bordeaux II
- Bowers JE, Dangl GS, Meredith CP (1996) Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39:628–633
- Bowers JE, Dangl GS, Meredith CP (1999) Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am J Enol Vitic* 50:243–246
- Calonnec A, Cartolaro P, Poupot C, Dubourdieu D, Darriet P (2004) Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. *Plant Pathol* 53:434–445
- Chen WJ, Delmotte F, Richard-Cervera S, Douence L, Greif C, Corio-Costet MF (2007) At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Appl Environ Microbiol* 73(16):5162–5172
- Chin DB, Arroyo-Garcia R, Ochoa OE, Kesseli RV, Lavelle DO et al (2001) Recombination and spontaneous mutation at the major cluster of resistance genes in lettuce (*Lactuca sativa*). *Genetics* 157:831–849
- Cipriani G, Di Gaspero G, Canaguier A, Jusseume J, Tassin J, Lemainque A, Vincent Thareau V, Adam-Blondon A-F, Testolin R (2011) Molecular linkage maps: strategies, resources and achievements. In: A-F Adam-Blondon, JM Martinez-Zapater, Chittaranjan Kole (eds) *Genetics, genomics and breeding of grapes*. Science Publishers and CRC Press, Florida, pp 111–136
- Dalbó MA, Ye GN, Weeden NF, Steinkellner H, Sefc KM, Reisch BI (2000) A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome* 43:333–340
- Di Gaspero G, Cipriani G, Marrazzo MT, Andretta D, Castro MJ, Peterlunger E et al (2005) Isolation of (AC)n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. *Mol Breed* 15:11–20
- Di Gaspero G, Cipriani G, Adam-Blondon AF, Testolin R (2007) Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. *Theor Appl Genet* 114:1249–1263
- Dick MW (2002) Binomials in the Peronosporales, Sclerosporales and Pythiales. In: Spencer PTN, Gisi U, Lebeda A (eds) *Advances in Downy Mildew Research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 225–266
- Doligez A, Bouquet A, Danglot Y, Lahogue L, Riaz S, Meredith P et al (2002) Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theor Appl Genet* 105:780–795
- Doligez A, Adam-Blondon AF, Cipriani G, Di Gaspero G, Laucou V, Merdinoglu D et al (2006) An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theor Appl Genet* 113:369–382
- Douclev M, Jin Y, Gao F, Riaz S, Krivanek AF, Walker MA (2004) A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*. *Theor Appl Genet* 109:1178–1187
- Dubos B (2002) *Maladies cryptogamiques de la vigne*, Féret edn. Bordeaux, France
- Fischer BM, Salakhutdinov I, Akkurt M, Eibach R, Edwards KJ, Töpfer R et al (2004) Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theor Appl Genet* 108:501–515
- Frye CA, Tang D, Innes RW (2001) Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:373–378
- Furuya S, Mochizuki M, Saito S, Kobayashi H, Takayanagi T, Suzuki S (2010) Monitoring of QoI fungicide resistance in *Plasmopara viticola* populations in Japan. *Pest Manag Sci* 66:1268–1272
- Gadoury DM, Seem RC, Ficke A, Wilcox WF (2001) The epidemiology of powdery mildew on Concord grapes. *Phytopathology* 91:948–955
- Galet P (1977) *Les maladies et les parasites de la vigne*, Imp. Paysan du Midi: Montpellier, France, vol. I
- Gallais A (1990) Quantitative genetics of doubled haploid populations and application to the theory of line development. *Genetics* 124:199–206
- Geffroy V, Macadre C, David P, Pedrosa-Harand A, Dauga C, Sevignac M, Langin T (2009) Molecular analysis of a large subtelomeric nucleotide-binding-site-leucine-rich-repeat family in two representative genotypes of the major gene pools of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 181:405–419
- Gisi U (2002) Chemical control of downy mildews. In: Spencer-Phillips PTN, Gisi U, Lebeda A (eds) *Advances in Downy Mildew Research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 119–159
- Gisi U, Sierotzki H (2008) Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur J Plant Pathol* 122(1):157–167
- Gisi U, Waldner M, Kraus N, Dubuis PH, Sierotzki H (2007) Inheritance of resistance to carboxylic acid amide (CAA) fungicides in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathol* 56:199–208
- Grando MS, Bellin D, Edwards KJ, Pozzi C, Stefanini M, Velasco R (2003) Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* Mchx. *Theor Appl Genet* 106:1213–1224
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C et al (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463–467
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12:172–175
- Lafon R, Clerjeau M (1988) Downy mildew. In: Pearson RC, Goheen AC (eds) *Compendium of grape diseases*. Am Phytopathol Soc, St. Paul, pp 11–13
- Lowe KM, Walker MA (2006) Genetic linkage map of the interspecific grape rootstock cross Ramsey (*Vitis champinii*) × Riparia Gloire (*Vitis riparia*). *Theor Appl Genet* 112:1582–1592
- Marguerit E, Boury C, Manicki A, Donnart M, Butterlin G, Némorin A et al (2009) Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theor Appl Genet* 118:1261–1278
- Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Coste P, Dumas V, Haetty S, Butterlin G et al (2003) Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Hort* 603:451–456
- Merdinoglu D, Butterlin G, Bevilacqua L, Chiquet V, Adam-Blondon AF, Decroocq S (2005) Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Mol Breed* 15:349–366
- Miclot AS, Wiedemann-Merdinoglu S, Duchêne E, Merdinoglu D, Mestre P (2012) A standardised method for the quantitative analysis of resistance to grapevine powdery mildew. *Eur J Plant Pathol*. doi:10.1007/s10658-011-9922-z
- Moreira FM, Madini A, Marino R, Zulini L, Stefanini M, Velasco R, Kozma P, Grando MS (2010) Genetic linkage maps of two

- interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Gen Genomes* 7:153–167
- Moroldo M, Paillard S, Marconi R, Fabrice L, Canaguier A, Cruaud C et al (2008) A physical map of the heterozygous grapevine ‘Cabernet Sauvignon’ allows mapping candidate genes for disease resistance. *BMC Plant Biol* 8:66
- Mullins MG, Bouquet A, Williams LE (1992) *Biology of the grapevine*. Cambridge Univ. Press, New York
- Olien WC (1990) The muscadine grape: Botany, viticulture, history and current industry. *Hort Sci* 25:732–739
- Olmo HP (1986) The potential role of (*vinifera* × *rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. *Experientia* 42:921–926
- Patel GI, Olmo HP (1955) Cytogenetics of *Vitis*: I. The hybrid of *V. vinifera* × *V. rotundifolia*. *Am J Bot* 42:141–159
- 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
- Pool RM, Pearson RC, Welser MJ, Lakso AN, Seem RC (1984) Influence of powdery mildew on yield and growth of Rosette grapevines. *Plant Dis* 68:590–593
- Regner F, Hack R, Santiago JL (2006) Highly variable *Vitis* microsatellite loci for the identification of Pinot Noir clones. *Vitis* 45:85–91
- Riaz S, Dangi GS, Edward KJ, Meredith CP (2004) A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theor Appl Genet* 108:864–872
- Riaz S, Tenscher A, Smith B, Ng D, Walker M (2008) Use of SSR markers to assess identity, pedigree, and diversity of cultivated *Muscadinia rotundifolia*. *J Am Soc Hort Sci* 133:559–568
- Riaz S, Tenscher AC, Ramming DW, Walker MA (2011) Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theor Appl Genet* 122:1059–1073
- Richter TE, Pryor TJ, Bennetzen JL, Hulbert SH (1995) New rust resistance specificities associated with recombination in the *Rpl* complex in maize. *Genetics* 141:373–381
- Rumbolz J, Kassemeyer HH, Steinmetz V, Deising HB, Mendgen K, Mathys D, Wirtz S (2000) Differentiation of infection structures of the powdery mildew fungus *Uncinula necator* and adhesion to the host cuticle. *Can J Bot* 78(3):409–421
- Salmaso M, Malacarne G, Troglio M, Faes G, Stefanini M, Grandi MS et al (2008) A grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic map integrating the position of 139 expressed genes. *Theor Appl Genet* 116:1129–1143
- Sefc KM, Regner F, Turetschek E, Glössl J, Steinkellner H (1999) Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42:367–373
- Small JK (1913) *Flora of the southeastern United States*, 2nd edn. New York, p 1394
- Sudupak MA, Bennetzen JL, Hulbert SH (1993) Unequal exchange and meiotic instability of disease-resistance genes in the *Rpl* region of maize. *Genetics* 133:119–125
- Thomas MR, Scott NS (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor Appl Genet* 86:985–990
- Troglio M, Malacarne G, Coppola G, Segala C, Cartwright DA, Pindo M et al (2007) A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs. *Genetics* 176:2637–2650
- Van Ooijen JW (2009) MapQTL6.0, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Wageningen, Kyazma B.V., the Netherlands
- Van Ooijen JW, Voorrips RE (2001) Joinmap3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research Int., Wageningen, Kyazma B.V., the Netherlands
- Velasco R, Zharkikh A, Troglio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* 2(12):e1326
- Weaver RJ (1976) *Grape growing*. Wiley, New York, p 371
- Welter LJ, Göktürk-Baydar N, Akkurt M, Maul E, Eibach R, Töpfer R et al (2007) Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Mol Breed* 20:359–374
- Wiedemann-Merdinoglu S, Prado E, Coste P, Dumas V, Butterlin G, and Merdinoglu D (2006) Genetic analysis of resistance to downy mildew derived from *Muscadinia rotundifolia*. Ninth International Conference on Grape Genetics and Breeding. Udine, Italy, July 2–6
- Wilcox WF, Burr JA, Riegel DG, Wong FP (2003) Practical resistance to QoI fungicides in New York populations of *Uncinula necator* associated with quantitative shifts in pathogen sensitivities. (Abstr.). *Phytopathology* 93:S90





**Annexe 3 : Liste des tableaux**

<b>Tableau 1.</b> Principales différences entre les genres <i>Vitis</i> et <i>Muscadinia</i> .....	16
<b>Tableau 2.</b> Les principaux gènes de résistance au mildiou identifiés chez les plantes. D = dominant ; R = récessif. ....	47
<b>Tableau 3.</b> Les principaux gènes de résistance à l'oïdium identifiés chez les plantes. D = dominant ; R = récessif. ....	48
<b>Tableau 4.</b> Inventaire des QTL de résistance au mildiou publiés à ce jour. Les QTL <i>Rpv4</i> , <i>Rpv5</i> et <i>Rpv6</i> ont été renommés ainsi après leur publication ( <a href="http://www.vivc.de">http://www.vivc.de</a> ).....	63
<b>Tableau 5.</b> Inventaire des QTL et gènes de résistance à l'oïdium publiés à ce jour. ....	68
<b>Tableau 6.</b> Nouveaux marqueurs microsatellites développés dans ce travail et intégrés à la carte génétique de <i>M. rotundifolia</i> . Source des amorces notées * : Paule Blasi (communication personnelle).....	79
<b>Tableau 7.</b> Le type de ségrégation retrouvé dans la descendance '42055' est codé comme le préconise le logiciel JoinMap®3.0 dans le cas d'une population F2. Les données manquantes sont indiquées par le symbole « -- ».....	81
<b>Tableau 8.</b> Pourcentage de SSR hétérozygotes (Htz), homozygotes (Hmz) et non interprétables (NI) par groupe de liaison génétique, pour ceux qui ont pu être effectivement attribués à un groupe de liaison de <i>V. vinifera</i> . La ligne « Multiloci » indique les SRR qui amplifient sur plusieurs régions génomiques chez <i>V. vinifera</i> . Les SSR non affectés (NA) représentent les marqueurs non précédemment cartographiés sur <i>V. vinifera</i> . ....	84
<b>Tableau 9.</b> Comparaison de la couverture génomique et des distances génétiques entre la carte génétique de référence pour <i>V. vinifera</i> de Doligez <i>et al.</i> (2006) et la carte génétique de <i>M. rotundifolia</i> . Mr = <i>M. rotundifolia</i> ; Vv = <i>Vitis vinifera</i> .....	92
<b>Tableau 10.</b> Distance physique entre les marqueurs les plus distaux communs aux deux cartes génétiques et référencés sur la séquence 12X du génome de la vigne ( <a href="http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/">http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/</a> ), et comparaison des distances physiques que couvrent 1cM de la carte de référence de <i>V. vinifera</i> et 1cM de la carte de <i>M. rotundifolia</i> , sur la base de la séquence 12X du génome de la vigne.....	94
<b>Tableau 11.</b> Comparaison des cartes génétiques de <i>M. rotundifolia</i> publiées à ce jour, utilisant les cultivars 'Regale' (Blanc <i>et al.</i> , 2012) et 'Fry' x 'Trayshed' (Riaz <i>et al.</i> , 2012).....	94
<b>Tableau 12.</b> Comparaison de la couverture génomique et des distances génétiques entre les cartes génétique de <i>M. rotundifolia</i> 'Regale' (Blanc <i>et al.</i> , 2012) et de <i>M. rotundifolia</i> 'Fry' x 'Trayshed' (Riaz <i>et al.</i> , 2012). ....	98
<b>Tableau 13.</b> Description des paramètres utilisés pour évaluer le niveau de résistance au mildiou dans la population '42055'.....	115

<b>Tableau 14.</b> Description des paramètres utilisés pour évaluer le niveau de résistance à l'oïdium dans la population '42055', d'après Miclot <i>et al.</i> (2011).....	120
<b>Tableau 15.</b> Valeurs moyennes et intervalles de confiance des critères OIV452, S, NEC et DN chez les contrôles et le parent de la population pour la résistance au mildiou, en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques (n=9). .....	122
<b>Tableau 16.</b> Paramètres statistiques descriptifs pour le paramètre OIV452 dans la population '42055', en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques (n=145). .....	123
<b>Tableau 17.</b> Résultat du test de Kruskal-Wallis effectué pour le paramètre OIV452, en considérant la moyenne des deux répétitions biologiques effectuées. ....	124
*= $P < 0.1$ ; **= $P < 0.05$ ; ***= $P < 0.01$ ; ****= $P < 0.005$ ; *****= $P < 0.001$ ; *****= $P < 0.0005$ ; *****= $P < 0.0001$ .....	124
<b>Tableau 18.</b> QTL de résistance à <i>P. viticola</i> détecté dans la population '42055'. La colonne 'Intervalle LOD2' désigne les positions correspondant au LOD score du QTL -2, soit l'intervalle de confiance du pic du QTL. ....	125
<b>Tableau 19.</b> Valeurs moyennes et intervalles de confiance des critères MYC et SPO chez les contrôles et le parent de la population pour la résistance à l'oïdium, en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques ('CS338', n=15 ; 'Cinsault', n=18 ; 'Regale', n=29). .....	126
<b>Tableau 20.</b> Paramètres statistiques descriptifs pour les paramètres de résistance à l'oïdium MYC et SPO dans la population '42055', en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques (n=126). .....	127
<b>Tableau 21.</b> Résultat du test de Kruskal-Wallis effectué pour les paramètres MYC et SPO, en considérant la moyenne des deux répétitions biologiques effectuées. ....	130
<b>Tableau 22.</b> QTL de résistance à <i>E. necator</i> détectés dans la population '42055' .....	132
<b>Tableau 23.</b> Valeurs moyennes et intervalles de confiance des critères MYC et SPO chez les contrôles et le parent de la population pour la résistance à l'oïdium, en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques (Chlo2b : 'Cinsault', n=18 ; 'Regale', n=29 ; A3 et B1 : 'Cinsault', n=2 ; 'Regale', n=2). .....	153

**Annexe 4 : Liste des figures**

<b>Figure 1.</b> L'importance de la tradition vinicole pour l'Homme est soulignée par sa large représentation dans l'art, la religion et la littérature. Ces photos sont quelques exemples de la manière dont les artistes se sont inspirés de la culture du vin. ....	10
<b>Figure 2a.</b> Localisation géographique des groupes de <i>Vitis</i> américains, asiatiques et européens. ....	12
<b>Figure 2b.</b> Localisation géographique de <i>Muscadinia rotundifolia</i> . ....	12
<b>Figure 3.</b> Classification de la muscadine (a) selon l'hypothèse de Planchon ; (b) selon l'hypothèse de Small, utilisée dans ce manuscrit. ....	15
<b>Figure 4.</b> Symptômes de maladies virales. (a) Le court-noué (photothèque INRA Colmar). Les parcelles infectées sont désignées par des flèches blanches ; (b) l'enroulement (Etienne Herrbach, INRA, Colmar). ....	19
<b>Figure 5.</b> Symptômes de maladies bactériennes. (a) La maladie de Pierce (©2000 The Regents of the University of California) ; (b) la Galle du Collet (omafra.gov.on.ca) ; (c) la flavescence dorée (inra.fr). ....	20
<b>Figure 6.</b> Symptômes de maladies générées par des insectes. (a) Le phylloxera (Etienne Herrbach, INRA, Colmar) ; (b) l'acariose (inra.fr) ; (c) les vers de la grappe (Gérard Hommay, INRA, Colmar). ....	23
<b>Figure 7.</b> Symptômes de maladies cryptogamiques. (a) La pourriture grise (photothèque INRA Colmar) ; (b) le black rot (Christophe Schneider, INRA, Colmar). ....	24
<b>Figure 8a.</b> Cycle de vie de <i>Plasmopara viticola</i> , l'agent causal du mildiou de la vigne (Agrios, 2005). ....	29
<b>Figure 8b.</b> Symptômes du mildiou de la vigne sur feuilles (photothèque INRA Colmar). ....	29
(1) Sur la face abaxiale ou inférieure ; (2) sur la face adaxiale ou supérieure. ....	29
<b>Figure 9a.</b> Cycle de vie d' <i>Erysiphe necator</i> , l'agent causal de l'oïdium de la vigne (Agrios, 2005). ....	33
<b>Figure 9b.</b> Symptômes de l'oïdium de la vigne (photothèque INRA Colmar). (1) Sur la face adaxiale des feuilles ; (2) sur de jeunes baies ; (3) sur des baies plus âgées. ....	33
<b>Figure 10.</b> Diagramme illustrant le fonctionnement sur plusieurs niveaux du système immunitaire des plantes selon le modèle en « zig-zag » (Jones & Dangl 2006). ....	43
<b>Figure 11.</b> Les principales familles de protéines de résistance (d'après McDowell & Woffenden, 2003). TIR : Toll/Interleukin Receptor ; CC : coiled-coil ; NB : Nucleotide Binding site ; LRR : Leucine Rich Repeat ; KIN : domaine Serine/Threonine Kinase. ....	43
<b>Figure 12.</b> Localisation chromosomique et origine des QTL de résistance au mildiou sur le génome de la vigne (carte physique d'après Moroldo <i>et al.</i> , 2008). ....	63

<b>Figure 13.</b> Localisation chromosomique et origine des QTL de résistance à l'oïdium sur le génome de la vigne (carte physique d'après Moroldo <i>et al.</i> , 2008). .....	68
<b>Figure 14.</b> Les individus de la population '42055' sont maintenus en serre, à raison d'un pot par génotype. ....	77
<b>Figure 15.</b> Exemples d'amplification de loci microsatellites. (a) hétérozygote, 2 formes alléliques présentes au locus ; (b) homozygote, une seule forme allélique au locus dans la population ; (c) non amplifié ou ininterprétable.....	83
<b>Figure 16.</b> Carte génétique de la population S1 issue de l'autofécondation de <i>M. rotundifolia</i> cv. Regale, comportant 20 groupes de liaison et 191 marqueurs moléculaires de type SSR. Les groupes de liaison sont numérotés 1 à 19 selon Adam-Blondon <i>et al.</i> (2004) et Doligez <i>et al.</i> (2006), et le GL restant est appelé GL20. ....	86
<b>Figure 17a.</b> Comparaison macrosyténique entre les GL1 de <i>M. rotundifolia</i> de <i>V. vinifera</i> (Doligez <i>et al.</i> , 2006). Les traits en pointillés relient les marqueurs communs entre les deux cartes génétiques. Les lignes verticales pleines sur la carte de <i>V. vinifera</i> indiquent des groupes de marqueurs dont l'ordre local n'est pas sûr à LOD 2.0.....	89
<b>Figure 17b.</b> Comparaison macrosyténique entre les GL6 et 12 de <i>M. rotundifolia</i> de <i>V. vinifera</i> (Doligez <i>et al.</i> , 2006). Légende détaillée : voir Figure 17a. ....	90
<b>Figure 18.</b> Comparaison macrosyténique entre le GL7 de <i>V. vinifera</i> (Doligez <i>et al.</i> , 2006) et les GL7 et 20 de <i>M. rotundifolia</i> . VMC9a3.1 et VMC8d11 (soulignés) sont séparés par 18,9 cM sur la carte de référence de <i>V. vinifera</i> , mais chez <i>M. rotundifolia</i> ils sont situés respectivement à l'extrémité inférieure du GL7 et supérieure du GL20. Les traits en pointillés relient les marqueurs communs entre les deux cartes génétiques.....	91
<b>Figure 20.</b> Représentation schématique des régions paralogues dérivées de trois génomes ancestraux chez <i>V.vinifera</i> , d'après Jaillon <i>et al.</i> (2007). Les sept couleurs correspondent vraisemblablement à des GL distincts dans le génome ancestral.....	105
<b>Figure 21.</b> 'Nested-fusion' par translocation réciproque symétrique, asymétrique, ou asymétrique avec repositionnement du bras donneur, d'après Schubert et Lysak (2011). L'un ou l'autre de ces mécanismes se produiraient selon le nombre de cassures double brin interagissant. Les petits fragments acrocentriques sont perdus durant la mitose et la méiose (Schubert & Lysak, 2011).....	106
<b>Figure 22.</b> Cycle de 'fusion-fission' chromosomique, d'après Schubert et Lysak (2011). .....	107
<b>Figure 23.</b> Schéma hypothétique expliquant la formation possible des caryotypes de <i>M. rotundifolia</i> et <i>V.vinifera</i> . Après la triploïdisation d'un ancêtre commun comportant 7 protochromosomes, aboutissant à la formation d'un intermédiaire n=21 chromosomes, on peut imaginer que deux remaniements majeurs impliquant deux fusions de chromosomes aient eu lieu pour donner les caryotypes actuels de <i>M. rotundifolia</i> (n=20) et <i>V.vinifera</i> (n=19). .....	108

**Figure 24.** Principales étapes de l'évaluation phénotypique de plantes pour leur résistance au mildiou. L'échelle de notation utilisée va de 1 (très sensible) à 9 (très résistant)..... 115

**Figure 25.** Schéma illustrant les étapes de désinfection préalables à l'inoculation des feuilles à infecter. Le 1<sup>er</sup> bac est rempli d'eau de javel, les 3 suivants d'eau stérile, et le dernier est vide et sert juste à égoutter les feuilles avant de les sécher entre 2 papiers buvards stériles. .... 116

**Figure 26.** Illustration du matériel et du mode opératoire utilisés pour les inoculations d'oïdium. (a) Les sacs de lavage sont tenus par une tige métallique pour faciliter le trempage des feuilles dans les bains successifs. (b) Les feuilles séchées sont placées dans des boîtes de culture carrées contenant de l'agar, le pétiole trempant dans la gélose. (c) Quatre boites contenant chacune 4 feuilles vernissées sont placées à la base d'une tour d'inoculation en carton, sous hotte stérile. Une feuille infestée d'oïdium est secouée au-dessus de la tour avec ajout d'un flux d'air..... 117

**Figure 27.** Deux enceintes à thermoplane assurent la réalisation des expérimentations sous éclairage contrôlé et à température constante..... 118

**Figure 28.** Principales étapes de l'évaluation phénotypique de plantes pour leur résistance à l'oïdium. L'échelle de notation utilisée va de 1 (très sensible) à 9 (très résistant). .... 118

**Figure 29.** Distribution en pourcentages de la résistance au mildiou dans la population '42055', pour le paramètre OIV452, pour (a) la première répétition biologique, n=137 (b) la seconde répétition biologique, n=112 (c) la valeur moyenne des deux répétitions biologiques, n=145. Les chiffres situés au-dessus des barres des histogrammes indiquent les effectifs par classe. .... 123

**Figure 30.** Localisation du QTL de résistance au mildiou sur le GL18 de *M. rotundifolia* en analyse par cartographie d'intervalle (SIM), pour le paramètre OIV452. Le pic du QTL se situe entre les marqueurs UDV130 et VMC6f11..... 125

**Figure 31.** Distribution en pourcentages de la résistance à l'oïdium dans la population '42055', pour le paramètre MYC, pour (a) la première répétition biologique, n=126 (b) la seconde répétition biologique, n=105 (c) la valeur moyenne des deux répétitions biologiques, n=126. Les chiffres situés au-dessus des barres des histogrammes indiquent les effectifs par classe. .... 127

**Figure 32.** Illustration du développement d'*E. necator* dans la population '42055', sur un génotype à MYC 8 (a et c) et sur un génotype à MYC 5 (b et d) ; a et b : photos macroscopiques ; c et d : photos réalisées sous la loupe (grossissement x50) ; myc = mycélium, nec = nécroses (indiquées par les flèches blanches) ; comp = conidiophore. .... 129

**Figure 33.** Localisation du QTL de résistance à l'oïdium sur le GL14 de *M. rotundifolia* en analyse par cartographie d'intervalle (SIM), pour le paramètre MYC. Le pic du QTL se situe au niveau des marqueurs VMC9c1 et Chr14V060. .... 132

**Figure 34.** Localisation du QTL mineur de résistance à l'oïdium du GL20 de *M. rotundifolia*. (a) Test de Kruskal et Wallis : \*= $P<0.1$  ; \*\*= $P<0.05$  ; \*\*\*= $P<0.01$  ; \*\*\*\*= $P<0.005$  ; \*\*\*\*\*= $P<0.001$  ; \*\*\*\*\*= $P<0.0005$  ; \*\*\*\*\*= $P<0.0001$  ; (b) Analyse par cartographie d'intervalle (SIM). Le pic du QTL se situe au niveau du marqueur VMC8d11. .... 133

<b>Figure 35.</b> Localisation du QTL mineur de résistance à l'oïdium du GL5 de <i>M. rotundifolia</i> , en analyse MQM, pour le paramètre MYC. Le pic du QTL se situe au niveau du marqueur VVIv21.....	133
<b>Figure 36.</b> Phénotype des individus de type 'vert' (a et c) et rouge (b et d) dans la population '42055'.....	134
<b>Figure 37.</b> Pourcentage d'individus de phénotypes 'vert' et 'rouge' observé dans la population '42055', n = 113. Les chiffres indiquent les effectifs par catégorie.....	135
<b>Figure 38.</b> Localisation du marqueur Col sur le GL4 de la carte génétique de <i>M. rotundifolia</i> . .....	135
<b>Figure 39.</b> Grappe de fruits portée par un pied de <i>M. rotundifolia</i> cv. Regale (Source : photothèque INRA Colmar). .....	141
<b>Figure 40.</b> Distribution en pourcentages de la résistance à l'oïdium des individus de la population '42055', pour le développement mycélien (moyenne des deux répétitions biologiques) sur la base de leur génotype au locus <i>Ren5</i> . (a) GL14 de <i>M. rotundifolia</i> et intervalle de confiance de <i>Ren5</i> (rectangle rouge), le marqueur VMC9c1 étant le plus fortement associé à <i>Ren5</i> . (b) Pourcentage d'individus par classe de résistance.....	148
<b>Figure 41.</b> Distribution de la résistance à l'oïdium des individus de la population '42055' pour la sporulation du champignon (moyenne des deux répétitions biologiques) sur la base de leur génotype au locus <i>Ren5</i> . Légende détaillée : voir Figure 40.....	149
<b>Figure 42.</b> Différentiation des structures d'infection d' <i>E. necator</i> , durant la phase de développement précoce du champignon sur <i>V. vinifera</i> cv. Müller-Thurgau (Rumbolz <i>et al.</i> , 2000). Les temps indiquent la première apparition du stade après inoculation. PA=primary appressorium (appressorium primaire) ; PH=primary hyphae (hyphe primaire) ; SH=secondary hyphae (hyphe secondaire).....	150
<b>Figure 43.</b> Images en microscopie électronique à balayage de génotypes <i>Ren5+</i> (132/132 au locus VMC9c1) et <i>Ren5-</i> (146/146 au locus VMC9c1), inoculés avec <i>E. necator</i> souche Chlo2b, à 4 hpi, 1 jpi et 2 jpi. Appressorium primaire : ap ; Hyphe primaire : hp ; Hyphe secondaire : hs. <i>V. vinifera</i> cv. Cinsault a été utilisé comme témoin sensible, et <i>M. rotundifolia</i> cv. Regale, parent de la population '42055', comme témoin résistant. ....	151
<b>Figure 44.</b> Niveau de résistance à l'oïdium à 7 jpi d'individus <i>Ren5+</i> et <i>Ren5-</i> de la population '42055' pour (a) le développement mycélien MYC (b) le niveau de sporulation SPO, en prenant en compte la moyenne des deux répétitions biologiques effectuées (barres noires : erreurs standard).....	154

# BIBLIOGRAPHIE





- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., and Martin, G.B.** (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**: 601–611.
- Abrouk, M., Murat, F., Pont, C., Messing, J., Jackson, S., Faraut, T., Tannier, E., Plomion, C., Cooke, R., Feuillet, C., and Salse, J.** (2010). Palaeogenomics of plants: synteny-based modelling of extinct ancestors. *Trends in Plant science* **15**: 479–487.
- Adam, L. and Somerville, S.C.** (1996). Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **9**: 341–356.
- Adam-Blondon, A.-F., Roux, C., Claux, D., Butterlin, G., Merdinoglu, D., and This, P.** (2004). Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome : a tool for grape genetics. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 1017–1027.
- Agrios, G.** (2005). *Plant Pathology*. Fifth edition. Elsevier, Burlington, MA, USA.
- Agrios, G.** (1997). *Plant Pathology*. Fourth edition. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Akkurt, M., Welter, L., Maul, E., Töpfer, R., and Zyprian, E.** (2007). Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). *Molecular Breeding* **19**: 103–111.
- Albrecht, E. and Chetelat, R.T.** (2009). Comparative genetic linkage map of Solanum sect. *Juglandifolia*: evidence of chromosomal rearrangements and overall synteny with the tomatoes and related nightshades. *Theoretical and Applied Genetics* **118**: 831–847.
- Alleweldt, G. and Possingham, J. V** (1988). Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics* **75**: 669–673.
- Allègre, M., Héloir, M.-C., Trouvelot, S., Daire, X., Pugin, A., Wendehenne, D., and Adrian, M.** (2009). Are grapevine stomata involved in the elicitor-induced protection against downy mildew? *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 977–986.
- Amores, A., Giles, V., Thode, G., and Alvarez, C.** (1990). Adaptive character of a Robertsonian fusion in chromosomes of the fish *Gobius paganellus* (Pisces, Perciformes). *Heredity* **65**: 151–155.
- Amrani, L. and Corio-Costet, M.-F.** (2006). A single nucleotide polymorphism in the  $\beta$ -tubulin gene distinguishing two genotypes of *Erysiphe necator* expressing different symptoms on grapevine. *Plant Pathology* **55**: 505–512.
- Aravind, L., Dixit, V.M., and Koonin, E. V** (1999). The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends in Biochemical Sciences* **24**: 47–53.
- Arroyo-García, R., Ruiz-García, L., Bolling, L., Ocete, R., López, M.A., Arnold, C., Ergul, A., Söylemezoğlu, G., Uzun, H.I., Cabello, F., Ibáñez, J., Aradhya, M.K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J.L., Costantini, L., Goris-Lavets, S., Grandó, M.S., Klein, B.Y., *et al.* (2006). Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology* **15**: 3707–3714.**
- Bachlava, E., Radwan, O.E., Abratti, G., Tang, S., Gao, W., Heesacker, A.F., Bazzalo, M.E., Zambelli, A., Leon, A.J., and Knapp, S.J.** (2011). Downy mildew (Pl (8) and Pl (14)) and rust (R (Adv)) resistance genes reside in close proximity to tandemly duplicated clusters of non-TIR-like NBS-LRR-encoding genes on sunflower chromosomes 1 and 13. *Theoretical and Applied Genetics* **122**: 1211–1221.

- Bai, Y., Van Der Hulst, R., Bonnema, G., Marcel, T.C., Meijer-Dekens, F., Niks, R.E., and Lindhout, P.** (2005). Tomato defense to *Oidium neolycopersici*: dominant Ol genes confer isolate-dependent resistance via a different mechanism than recessive ol-2. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 354–362.
- Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N.F., Reinstädler, A., Lotti, C., De Giovanni, C., Ricciardi, L., Lindhout, P., Visser, R., Theres, K., and Panstruga, R.** (2008). Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of mlo function. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 30–39.
- Bailey, B.A., Dean, J.F.D., and Anderson, J.D.** (1990). An Ethylene Biosynthesis-Inducing Endoxylanase Elicits Electrolyte Leakage and Necrosis in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi Leaves. *Plant Physiology* **94**: 1849–1854.
- Bailey, P.** (1934). Vites peculiares ad Americam Borealem. *Gentes Herbarum* III (Fasc. IV). 151–244.
- Bakshi, S., Sztejnberg, A., and Yarden, O.** (2001). Isolation and Characterization of a Cold-Tolerant Strain of *Fusarium proliferatum*, a Biocontrol Agent of Grape Downy Mildew. *Phytopathology* **91**: 1062–1068.
- Barka, E., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J., and Audran, J.C.** (2000). Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *Federation of European Microbiological Societies -Microbiology Letters* **186**: 91–95.
- Barka, E.A., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J., and Belarbi, A.** (2002). Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control* **24**: 135–142.
- Barker, C.L., Donald, T., Pauquet, J., Ratnaparkhe, M.B., Bouquet, A., Adam-Blondon, A.-F., Thomas, M.R., and Dry, I.** (2005). Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theoretical and Applied Genetics* **111**: 370–7.
- Baudoin, A., Tech, V., Olaya, G., Protection, S.C., Beach, V., Colcol, J.F., and Sierotzki, H.** (2008). QoI Resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the Mid-Atlantic United. *Plant Health Progress*.
- Baudouin, J.** (2012). Enquête : Le poids du vin en France. *La revue du Vin de France* - n°559: 34–43.
- Bejan, C. and Visoiu, E.** (2011). Resveratrol biosynthesis on in vitro culture conditions in grapevine (cv. Feteasca Neagra and Cabernet Sauvignon) under the action of AlCl<sub>3</sub> as elicitor agent. *Romanian Biotechnological Letters* **16**: 97–101.
- Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A.-F., Cipriani, G., Morgante, M., Testolin, R., and Di Gaspero, G.** (2009). Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine “Bianca” is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theoretical and Applied Genetics* **120**: 163–176.
- Bent, A.F. and Mackey, D.** (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology* **45**: 399–436.
- Bertero de Romano, A., Romano, C., Bulos, M., Alteri, E., and Sala, C.** (2010). A new gene for resistance to downy mildew in sunflower. In: *Proceedings of ISA Symposium “Progress in breeding sunflower for resistance to disease”*, Krasnodar, Russia. 142–147.
- Van Der Biezen, E. and Jones, J.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 454–456.

- Bittner-Eddy, P.D., Crute, I.R., Holub, E.B., and Beynon, J.L.** (2000). *RPP13* is a simple locus in *Arabidopsis thaliana* for alleles that specify downy mildew resistance to different avirulence determinants in *Peronospora parasitica*. *Plant Journal* **21**: 177–188.
- Blanc, M.** (2003). La protection contre les vers de la grappe en viticulture biologique. Techn'ITAB Viticulture, octobre 2003.
- Blanc, S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Dumas, V., Mestre, P., and Merdinoglu, D.** (2012). A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of *Ren5*, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew. *Theoretical and Applied Genetics* **125**: 1663–1675.
- Blanco, A., Gadaleta, A., Cenci, A., Carluccio, A. V., Abdelbacki, A.M.M., and Simeone, R.** (2008). Molecular mapping of the novel powdery mildew resistance gene *Pm36* introgressed from *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* in durum wheat. *Theoretical And Applied Genetics* **117**: 135–142.
- Blasi, P.** (2010). Analyse génétique comparée de la résistance à *Plasmopara viticola* chez les espèces apparentées à la vigne - Thèse doct., Université de Strasbourg, France.
- Blasi, P., Blanc, S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Prado, E., Rühl, E.H., Mestre, P., and Merdinoglu, D.** (2011). Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical and Applied Genetics* **123**: 43–53.
- Bonierbale, M.W., Plaisted, R.L., and Tanksley, S.D.** (1988). RFLP Maps Based on a Common Set. *Genetics* **120**: 1095–1103.
- Bonnier, F.J.M., Reinink, K., and Groenwold, R.** (1994). Genetic analysis of *Lactuca* accessions with new major gene resistance to lettuce downy mildew. *Phytopathology* **84**: 462–468.
- Botella, M.A., Parker, J.E., Frost, L.N., Bittner-Eddy, P.D., Beynon, J.L., Daniels, M.J., Holub, E.B., and Jones, J.D.** (1998). Three genes of the *Arabidopsis RPP1* complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. *The Plant Cell* **10**: 1847–1860.
- Boubals, D.** (1961). Etude des causes de la résistance des Vitacées à l'oidium de la vigne et de leur mode de transmission héréditaire. *Annales de l'Amélioration des Plantes* **11**: 401–500.
- Bouquet, A.** (1983). Contribution à l'étude de l'espèce *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small et de ses hybrides avec *Vitis vinifera* L. Applications en sélection - Thèse doct., Université Bordeaux II, France.
- Bouquet, A.** (1981). *Vitis* x *Muscadinia* hybridization : A new way in grape breeding for disease resistance in France. Proc. 3rd Intl. Symp. Grape Breeding, 1980. Univ. of California, Davis. 42–61.
- Bouscaut, J. and Corio-Costet, M.-F.** (2007). Detection of a Specific Transposon in *Erysiphe necator* from Grapevines in France. *Journal of Phytopathology* **155**: 381–383.
- Bowers, J.E., Dangl, G.S., and Meredith, C.P.** (1999). Development and Characterization of Additional Microsatellite DNA Markers for Grape. *American Journal of Enology and Viticulture* **50**: 243–246.
- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R., and Meredith, C.P.** (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome National Research Council Canada* **39**: 628–633.

- Brewer, M.T. and Milgroom, M.G.** (2010). Phylogeography and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, from diverse *Vitis* species. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 268.
- Brown, G.G., Formanová, N., Jin, H., Wargachuk, R., Dendy, C., Patil, P., Laforest, M., Zhang, J., Cheung, W.Y., and Landry, B.S.** (2003). The radish *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **35**: 262–272.
- Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Guerin-Dubrana, L., and Rey, P.** (2011). Characterization of endophytic microflora colonizing wood tissues of healthy and Esca-diseased vines. *Phytopathology* **101**: S21–S21.
- Brun, H., Chèvre, A.-M., Fitt, B.D.L., Powers, S., Besnard, A.-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M., and Andrivon, D.** (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *The New phytologist* **185**: 285–299.
- Brun, L. a, Le Corff, J., and Maillet, J.** (2003). Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. *Environmental Pollution* **122**: 361–368.
- Brunner, S., Keller, B., and Feuillet, C.** (2003). A large rearrangement involving genes and low-copy DNA interrupts the microcollinearity between rice and barley at the *Rph7* locus. *Genetics* **164**: 673–683.
- Burch-Smith, T.M., Schiff, M., Liu, Y., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2006). Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **142**: 21–27.
- Burruano, S., Torta, G., and Conigliaro, L.** (1998). Associazione tra *Acremonium byssoides* e *Plasmopora viticola*. *Micologia Italiana* **1**: 19–22.
- Butault, J., Dedryver, C., Gary, C., Guichard, L., Jacquet, F., Meynard, J., Nicot, P., Pitrat, M., Reau, R., Sauphanor, B., Savini, I., and Volay, T.** (2010). Quelles voies pour réduire l’usage des pesticides, Synthèse du rapport d’étude. Ecophyto R&D, Ed. INRA (France).
- Buzzell, R. and Haas, J.** (1978). Inheritance of adult plant resistance to powdery mildew in soybeans. *Journal Canadien de Génétique et Cytologie* **20**: 151–153.
- Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, a, Van Daelen, R., Van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F., and Schulze-Lefert, P.** (1997). The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* **88**: 695–705.
- Cadle-davidson, L.** (2010). Variation Within and Among *Vitis* spp. for Foliar Resistance to the Powdery Mildew Pathogen *Erysiphe necator*. *Plant Disease* **95**: 202–211.
- Cadle-Davidson, L.** (2008). Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Plant Disease* **92**: 1577–1584.
- Cadle-davidson, L., Mahanil, S., Gadoury, D.M., Kozma, P., and Reisch, B.I.** (2011). Natural infection of *Run1*-positive vines by naïve genotypes of *Erysiphe necator*. *Vitis* **50**: 173–175.
- Calenge, F., Drouet, D., Denancé, C., Van De Weg, W.E., Brisset, M.-N., Paulin, J.-P., and Durel, C.-E.** (2005). Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theoretical And Applied Genetics* **111**: 128–135.
- Carlsson, M., Bothmer, R., and Merker, A.** (2004). Screening and evaluation of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) and clubroot

- (*Plasmodiophora brassicae*) in genetic resources of *Brassica oleracea*. *Hereditas* **141**: 293–300.
- Cartolaro, P. and Steva, H.** (1990). Control of powdery mildew infection in grapevine in laboratory: an essential step to study fungicide resistance [*Uncinula necator*]. *Phytoma* **419**: 37–40.
- Chen, W.-J., Delmotte, F., Richard-Cervera, S., Douence, L., Greif, C., and Corio-Costet, M.-F.** (2007). At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5162–5172.
- Chen, X. and Ronald, P.C.** (2011). Innate immunity in rice. *Trends in Plant Science* **16**: 451–459.
- Ciccarese, F., Amenduni, M., Schiavone, D., and Citrulli, M.** (1998). Occurrence and inheritance of resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersici*) in *Lycopersicon* species. *Plant Pathology* **47**: 417–419.
- Cipriani, G., Di Gaspero, G., Canaguier, A., Jusseaume, J., Tassin, J., Lemainque, A., Thareau, V., Adam-Blondon, A.-F., and Testolin, R.** (2011). Molecular linkage maps : strategies, resources and achievements. In In: A-F Adam-Blondon, JM Martinez-Zapater, C Kole (eds) *Genetics, genomics and breeding of grapes*. Science Publishers and CRC Press, Florida, pp. 111–136.
- Coelho, P. and Monteiro, A.** (2003). Expression of resistance to downy mildew at cotyledon and adult plant stages in *Brassica oleracea* L. *Euphytica* **133**: 279–284.
- Cohen, Y., Cohen, S., Eyal, H., and Thomas, C.** (1985). Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo* PI 124111. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* **8**: 36–38.
- Colbert, T., Till, B.J., Tompa, R., Reynolds, S., Steine, M.N., Yeung, a T., McCallum, C.M., Comai, L., and Henikoff, S.** (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiology* **126**: 480–484.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., and Pang, E.C.K.** (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* **142**: 169–196.
- Consonni, C., Humphry, M.E., Hartmann, H.A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., Vogel, J., Lipka, V., Kemmerling, B., Schulze-Lefert, P., Somerville, S.C., and Panstruga, R.** (2006). Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature Genetics* **38**: 716–720.
- Corio-Costet, M.-F.** (2007). *Erysiphe necator* (Coll. Monographies de microbiologie), Lavoisier.
- Correll, J.C., Bluhm, B.H., Feng, C., Lamour, K., Toit, L.J., and Koike, S.T.** (2010). Spinach: better management of downy mildew and white rust through genomics. *European Journal of Plant Pathology* **129**: 193–205.
- Cortesi, P., Mazzoleni, A., Pizzatti, C., Milgroom, M.G., Vegetale, P., and Milan, I.-** (2005). Genetic Similarity of Flag Shoot and Ascospore Subpopulations of *Erysiphe necator* in Italy †. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7788–7791.
- Coutin, R.** (2002). Acariens et Insectes de la Vigne. *Insectes* **3**: 19–22.
- Crute, I.R.** (1992). The role of resistance breeding in the intergrated control of downy mildew (*Bremia lactucae*) in protected lettuce. *Euphytica* **63**: 95–102.
- Dalbó, M.** (1998). Genetic mapping, QTL analysis, and marker-assisted selection for disease resistance loci in grapes. PhD diss., Cornell Univ., Ithaca, N.Y.

- Dalbó, M. a, Ye, G.N., Weeden, N.F., Steinkellner, H., Sefc, K.M., and Reisch, B.I.** (2000). A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome* **43**: 333–340.
- Dalbó, M., Ye, G., Weeden, N., Wilcox, W., and Reisch, B.** (2001). Marker-assisted Selection for Powdery Mildew Resistance in Grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**: 83–89.
- Danan, S., Chauvin, J.-E., Caromel, B., Moal, J.-D., Pellé, R., and Lefebvre, V.** (2009). Major-effect QTLs for stem and foliage resistance to late blight in the wild potato relatives *Solanum sparsipilum* and *S. spegazzinii* are mapped to chromosome X. *Theoretical and Applied Genetics* **119**: 705–719.
- Darvasi, A., Weinreb, A., Minke, V., Weller, J.I., and Soller, M.** (1993). Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* **134**: 943–951.
- Deacon, J.** (2006). *Fungal Biology*, fourth edition, Blackwell Publishing Ltd.
- Delière, L., Cartolaro, P., Naud, O., Léger, B., Goutouly, J., and Davidou, L.** (2008). Mildiou et oïdium de la vigne – pour des décisions coordonnées : conception et évaluation de Mildium, un processus opérationnel de décision pour une gestion fongicide coordonnée à apport réduit. *Phytoma - La Défense des Végétaux* **621**: 20–24.
- Delmotte, F., Giresse, X., Richard-Cervera, S., M'baya, J., Vear, F., Tourvieille, J., Walser, P., and De Labrouhe, D.T.** (2008). Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution* **8**: 534–540.
- Delseny, M.** (2004). Re-evaluating the relevance of ancestral shared synteny as a tool for crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 126–131.
- Delye, C. and Corio-Costet, M.-F.** (1998). Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*: RAPD analysis discriminates two biotypes. *Mycological Research* **102**: 283–288.
- Desloire, S., Gherbi, H., Laloui, W., Marhadour, S., Clouet, V., Cattolico, L., Falentin, C., Giancola, S., Renard, M., Budar, F., Small, I., Caboche, M., Delourme, R., and Bendahmane, A.** (2003). Identification of the fertility restoration locus, *Rfo*, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO reports* **4**: 588–594.
- Detjen, L.** (1919a). The limits in hybridisation of *Vitis rotundifolia* with related species and genera (a). *North Carolina Agric Exp Stat Bull* **17**: 409–429.
- Detjen, L.** (1919b). The limits in hybridisation of *Vitis rotundifolia* with related species and genera (b). *North Carolina Agric Exp Stat Bull* **18**: 1–50.
- Devos, K.M.** (2005). Updating the “crop circle”. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 155–162.
- Devoto, A., Hartmann, H.A., Piffanelli, P., Elliott, C., Simmons, C., Taramino, G., Goh, C.-S., Cohen, F.E., Emerson, B.C., Schulze-Lefert, P., and Panstruga, R.** (2003). Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane *MLO* family. *Journal of Molecular Evolution* **56**: 77–88.
- Doganlar, S., Frary, A., Daunay, M.-C., Lester, R.N., and Tanksley, S.D.** (2002). A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the *Solanaceae*. *Genetics* **161**: 1697–1711.
- Dogimont, C., Chovelon, V., Tual, S., Boissot, N., Rittener, V., and Giovinazzo, N.** (2008). Molecular diversity at the *Vat/Pm-W* resistance locus in melon.

- Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Cucurbitaceae*. Avignon (France): 219–228.
- Doligez, a., Bouquet, A., Danglot, Y., Lahogue, F., Riaz, S., Meredith, P., Edwards, J., and This, P.** (2002). Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera L.*) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theoretical and Applied Genetics* **105**: 780–795.
- Doligez, A., Adam-Blondon, A.-F., Cipriani, G., Di Gaspero, G., Laucou, V., Merdinoglu, D., Meredith, C.P., Riaz, S., Roux, C., and This, P.** (2006). An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theoretical and Applied Genetics* **113**: 369–382.
- Donald, T.M., Pellerone, F., Adam-Blondon, A.-F., Bouquet, A., Thomas, M.R., and 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.
- Doruchowski, R. and Lakowska-Ryk, E.** (1992). Inheritance of resistance to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis* Berk & Curt) in *Cucumis sativus*. Proc. 5th EUCARPIA *Cucurbitaceae* Symp., Warsaw, Poland.: p. 66–69.
- Doster, M.A. and Schnathorst, W.C.** (1985). Effects of Leaf Maturity and Cultivar Resistance on Development of the Powdery Mildew Fungus on Grapevines. *Phytopathology* **75**: 318.
- Doucleff, M., Jin, Y., Gao, F., Riaz, S., Krivanek, a F., and Walker, M. a** (2004). A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 1178–87.
- Dufour, M.** (2011). Etude de l'efficacité des défenses de différents génotypes de *Vitis* induites par élicitation face à la diversité génétique de bioagresseurs (*Plasmopara viticola* et *Erysiphe necator*): du gène au champ - Thèse doct., Universités de Bordeaux, France.
- Dufour, M.-C., Druelle, L., Sauris, P., Taris, G., and Corio-Costet, M.-F.** (2009). Efficacité de stimulateurs de défenses des plantes (BTH et phosphonates) sur l'oïdium et le mildiou de la vigne : impact de la diversité des pathogènes. In AFPP- 9ème Conférence Internationale sur les maladies des Palntes - Tours 8 et 9 Décembre 2009.
- Dufour, M.C., Lambert, C., Bouscaut, J., Mérillon, J.M., and Corio-Costet, M.F.** (2012). Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*.
- Dunstan, R.** (1962). Some fertile hybrids of bunch and muscadine grapes. *Journal of Heredity* **53**: 299–303.
- Dussle, C.M., Hahn, V., Knapp, S.J., and Bauer, E.** (2004). *PlArg* from *Helianthus argophyllus* is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower. *Theoretical And Applied Genetics* **109**: 1083–1086.
- Délye, C., Laigret, F., and Corio-Costet, M.F.** (1997). RAPD Analysis Provides Insight into the Biology and Epidemiology of *Uncinula necator*. *Phytopathology* **87**: 670–7.
- Eckhardt, N.** (2002). Screening and evaluation of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) and clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in genetic resources of *Brassica oleracea*. *The Plant Cell* **14**: 1983–1987.
- Einset, J. and Pratt, C.** (1975). Grapes. In J. Janick & JN Moore (eds.). *Advances in fruit breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Ind., pp. 130–153.



- Ellwood, S.R., Phan, H.T., Jordan, M., Hane, J., Torres, A.M., Avila, C.M., Cruz-Izquierdo, S., and Oliver, R.P.** (2008). Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba L.*); conservation of genome structure with *Lens culinaris*. *BMC Genomics* **9**: 380.
- Epinat, C., Pitrat, M., and Bertrand, F.** (1993). Genetic analysis of resistance of five melon ines to powdery mildews. *Euphytica* **65**: 135–144.
- Espino, R. and Nesbitt, W.** (1982). Infection and development of *Plasmopara viticola* (B. et C.) Berl. et de T. on resistant and susceptible grapevines (*Vitis* sp.). *Philippine Journal of Crop Science* **7**: 114–116.
- Van Ettekoven, K. and Van der Arend, A.J.M.** (1999). Identification and denomination of “new” races of *Bremia lactucae*. In: Lebeda, A. and Kristkova, E. (eds): *Eucarpia Leafy Vegetables '99*. Palacky University, Olomouc. In Lebeda, A. and Kristkova, E. (eds): *Eucarpia Leafy Vegetables '99*. Palacky University, Olomouc, pp. 171–175.
- Eurostat** (2007). The use of plant protection products in the European Union. Data 1992- 2003. In at statistical books. European Commission. Edition 2007, 222 pp.
- Evans, K., Scott, E., and Whisson, D.** (1997). Heterothallism among South Australian clonal lines of *Uncinula necator*. *Australasian Plant Pathology* **26**: 10–20.
- Evans, K.J., Whisson, D.L., Stummer, B.E., and Scott, E.S.** (1997). DNA markers identify variation in Australian populations of *Uncinula necator*. *Mycological Research* **101**: 923–932.
- Falk, S., Gadoury, D., Pearson, R., and Seem, R.** (1995). Partial control of grape powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *The American Phytopathological Society* **79**: 483–490.
- Falk, S.P., Pearson, R.C., Gadoury, D.M., Seem, R.C., and Szejnberg, A.** (1996). *Fusarium proliferatum* as a biocontrol agent against grape downy mildew. *Phytopathology* **86**: 1010–1017.
- Fanourakis, N.E.** (1984). Inheritance and linkage studies of the fruit epidermis structure and investigation of linkage relations of several traits and of meiosis in cucumber. PhD. Diss., Univ. of Wisconsin, Madison.
- Feechan, A., Jermakow, A.M., Torregrosa, L., Panstruga, R., Dry, I.B., A, A.M.J.A.F., B, L.T., C, R.P., and A, I.B.D.** (2008). Identification of grapevine *MLO* gene candidates involved in susceptibility to powdery mildew. *Functional Plant Biology* **35**: 1255–1266.
- Feechan, A., Kabbara, S., and Dry, I.A.N.B.** (2011). Mechanisms of powdery mildew resistance in the *Vitaceae* family. *Molecular Plant Pathology* **12**: 263–274.
- Ficke, A., Gadoury, D.M., and Seem, R.C.** (2002). *New Frontiers in Plant Disease Losses and Disease Management Ontogenic Resistance and Plant Disease Management : A Case Study of Grape Powdery Mildew*. *The American Phytopathological Society* **92**: 671–675.
- Fischer, B.M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K.J., Töpfer, R., and Zyprian, E.M.** (2004). Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 501–515.
- Fischer, R.** (1918). The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* **52**: 399–433.
- Fondevilla, S., Carver, T.L.W., Moreno, M.T., and Rubiales, D.** (2006). Macroscopic and histological characterisation of genes *er1* and *er2* for powdery mildew resistance in pea. *European Journal of Plant Pathology* **115**: 309–321.

- Fondevilla, S., Torres, A., Moreno, M., and Rubiales, D.** (2007). Identification of a new gene for resistance to *Erysiphe pisi* Syd. in pea. *Breeding Science* **57**: 181–184.
- Fregoni, M.** (1991). Origines de la vigne et de la viticulture. Musumeci, Quart Italie.
- Frenkel, O., Brewer, M.T., and Milgroom, M.G.** (2010). Variation in pathogenicity and aggressiveness of *Erysiphe necator* from different *Vitis* spp. and geographic origins in the eastern United States. *Phytopathology* **100**: 1185–1193.
- Frye, C. a, Tang, D., and Innes, R.W.** (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 373–378.
- Fu, D.-Q., Zhu, B.-Z., Zhu, H.-L., Jiang, W.-B., and Luo, Y.-B.** (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal* **43**: 777–786.
- Fu, Y.-M., Jiang, W.-M., and Fu, C.-X.** (2011). Identification of species within *Tetrastigma* (Miq.) Planch. (Vitaceae) based on DNA barcoding techniques. *Journal of Systematics and Evolution* **49**: 237–245.
- Furuya, S., Mochizuki, M., Saito, S., Kobayashi, H., Takayanagi, T., and Suzuki, S.** (2010). Monitoring of QoI fungicide resistance in *Plasmopara viticola* populations in Japan. *Pest Management Science* **66**: 1268–1272.
- Gadoury, D. and Pearson, R.** (1991). Heterothallism and pathogenic specialization in *Uncinula necator*. *Phytopathology* **81**: 1287–1293.
- Gadoury, D.M., Seem, R.C., Ficke, A., and Wilcox, W.F.** (2003). Ontogenic resistance to powdery mildew in grape berries. *Phytopathology* **93**: 547–555.
- Gadoury, D.M., Seem, R.C., Ficke, A., and Wilcox, W.F.** (2001). The epidemiology of powdery mildew on concord grapes. *Phytopathology* **91**: 948–955.
- Galet, P.** (1988). Les hybrides producteurs directs. In Galet P (ed) Cépages et vignobles de France. Imprimerie Charles DEHAN, Parc Euromédecine. Montpellier, France, vol 1, pp. 369–523.
- Galet, P.** (1977). Les maladies et les parasites de la vigne. In Tome 1. Les maladies dûes à des végétaux. Le Paysan du Midi, Montpellier.
- Gallais, A.** (1993). La sélection assistée par marqueurs. *Le Sélectionneur Français* **43**: 43–62.
- Di Gaspero, G., Cipriani, G., Adam-Blondon, A.-F., and Testolin, R.** (2007). Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. *Theoretical and Applied Genetics* **114**: 1249–1263.
- Di Gaspero, G., Cipriani, G., Marrazzo, M.T., Andretta, D., Jesus, M., Peterlunger, E., and Testolin, R.** (2005). Isolation of (AC)n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. *Molecular Breeding* **15**: 11–20.
- Di Gaspero, G., Peterlunger, E., Testolin, R., Edwards, K.J., and Cipriani, G.** (2000). Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 301–308.
- Gebhardt, C. and Valkonen, J.P.** (2001). Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 79–102.
- Gebhardt, C., Walkemeier, B., Henselewski, H., Barakat, A., Delseny, M., and Stüber, K.** (2003). Comparative mapping between potato (*Solanum tuberosum*) and *Arabidopsis thaliana* reveals structurally conserved domains and ancient duplications in the potato genome. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **34**: 529–541.
- Geldermann, H.** (1975). Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. *Theoretical and Applied Genetics* **46**: 319–330.

- George, M.L.C., Prasanna, B.M., Rathore, R.S., Setty, T.A.S., Kasim, F., Azrai, M., Vasal, S., Balla, O., Hautea, D., Canama, A., Regalado, E., Vargas, M., Khairallah, M., Jeffers, D., and Hoisington, D. (2003). Identification of QTLs conferring resistance to downy mildews of maize in Asia. *Theoretical And Applied Genetics* **107**: 544–551.
- De Giovanni, C., Dell’Orco, P., Bruno, A., Ciccicarese, F., Lotti, C., and Ricciardi, L. (2004). Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (*ol-2*) in tomato. *Plant Science* **166**: 41–48.
- Gisi, U. and Sierotzki, H. (2008). Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology* **122**: 157–167.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., and McCaffery, A. (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* **58**: 859–867.
- Gisi, U., Waldner, M., Kraus, N., Dubuis, P.H., and Sierotzki, H. (2007). Inheritance of resistance to carboxylic acid amide (CAA) fungicides in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* **56**: 199–208.
- Glawe, D.A. (2008). The powdery mildews: a review of the world’s most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 27–51.
- Gobbin, D., Rumbou, A., Linde, C.C., and Gessler, C. (2006). Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards. *Molecular Plant Pathology* **7**: 519–531.
- Goldy, R. (1992). Breeding Muscadine Grapes. In *Horticultural Reviews*, Volume 14, p. Chapter 8.
- Goldy, R. and Onokpise, O. (2001). Muscadine Grapes - Genetics and Breeding. In *Muscadine Grapes*, F.M. Basiouny and D.G. Himelrick, eds (ASHS Crop Production Series), pp. 51, 65–67.
- Goldy, R.G., Ballinger, W.E., Maness, E.P., and Shallow, W.H. (1987). Anthocyanin content of fruit, stem, tendril, leaf, and leaf petioles in muscadine grape. *Journal of American Society for Horticultural Science* **112**: 882–882.
- Gong, L., Pachner, M., Kalai, K., and Lelley, T. (2008). SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita moschata* and its synteny with *Cucurbita pepo*. *Genome* **51**: 878–87.
- Graham, M. a, Marek, L.F., and Shoemaker, R.C. (2002). Organization, expression and evolution of a disease resistance gene cluster in soybean. *Genetics* **162**: 1961–1977.
- Grando, M.S., Bellin, D., Edwards, K.J., Pozzi, C., Stefanini, M., and Velasco, R. (2003). Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* Mchx. *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 1213–1224.
- Grenville-Briggs, L.J. and Van West, P. (2005). The biotrophic stages of oomycete-plant interactions. *Advances in Applied Microbiology* **57**: 217–243.
- Griffiths, A.J., Gelbar, W.M., Miller, J.H., and Lewontin, R.C. (2001). *Analyse génétique moderne*. De Boeck Université, Paris.
- Grube, R.C., Radwanski, E.R., and Jahn, M. (2000). Comparative genetics of disease resistance within the *Solanaceae*. *Genetics* **155**: 873–887.
- Harrington, L.A. and Greider, C.W. (1991). Telomerase primer specificity and chromosome healing. *Nature* **353**: 451–454.
- Hartley, S.E. and Horne, M.T. (1984). Chromosome relationships in the genus *Salmo*. *Chromosoma* **90**: 229–237.
- Haverkort, a. J., Boonekamp, P.M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. a. P., Kessel, G.J.T., Visser, R.G.F., and Vossen, E. a. G. (2008). Societal Costs of Late Blight

- in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Research* **51**: 47–57.
- Hedrick, U.** (1908). The relation of weather to the setting of fruit; with blooming data for 866 varieties of fruit. Bulletin n°299 - Agricultural Experiment Station: 82.
- Heintz, C. and Blaich, R.** (1990). Ultrastructural and histochemical studies on interactions between *Vitis vinifera* L. and *Uncinula necator* (Schw.) Burr. *New Phytologist* **115**: 107–117.
- Heringa, R.J., van Noveland, A., and Tazelaar, M.F.** (1969). Resistance to powdery mildew (*E. polygoni*) in peas (*P. sativum* L.). *Euphytica* **18**: 163–169.
- Hileman, L.C., Drea, S., De Martino, G., Litt, A., and Irish, V.F.** (2005). Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *The Plant Journal* **44**: 334–341.
- Hocquigny, S., Pelsy, F., Dumas, V., Kindt, S., Heloir, M.-C., and Merdinoglu, D.** (2004). Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome National Research Council Canada* **47**: 579–589.
- Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Z., Testolin, R., and Kozma, P.** (2008). Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine “Kishmish vatkana” is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theoretical and Applied Genetics* **116**: 427–38.
- Holub, E.B.** (2001). The arms race is ancient history in *Arabidopsis*, the wildflower. *Nature Reviews Genetics* **2**: 516–527.
- Holub, E.B. and Beynon, J.L.** (1997). Symbiology of mouse-ear cress (*Arabidopsis thaliana*) and oomycetes. *Advances in Botanical Research* **24**: 227–273.
- Holub, E.B., Beynon, J.L., and Crute, I.R.** (1994). Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**: 223–239.
- Van Der Hoorn, R. AL, De Wit, P.J., and Joosten, M.H.** (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends in Plant Science* **7**: 67–71.
- Hua, W., Liu, Z., Zhu, J., Xie, C., Yang, T., Zhou, Y., Duan, X., Sun, Q., and Liu, Z.** (2009). Identification and genetic mapping of pm42, a new recessive wheat powdery mildew resistance gene derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. dicoccoides). *Theoretical and Applied Genetics* **119**: 223–230.
- Huang, X.-Q. and Röder, M.S.** (2004). Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: A review. *Euphytica* **137**: 203–223.
- Hulbert, S.H., Webb, C.A., Smith, S.M., and Sun, Q.** (2001). Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 285–312.
- Irish, B.M., Correll, J.C., Feng, C., Bentley, T., and De Los Reyes, B.G.** (2008). Characterization of a resistance locus (Pfs-1) to the spinach downy mildew pathogen (*Peronospora farinosa* f. sp. spinaciae) and development of a molecular marker linked to Pfs-1. *Phytopathology* **98**: 894–900.
- Jacobsen, E. and Schouten, H.J.** (2008). Cisgenesis, a New Tool for Traditional Plant Breeding, Should be Exempted from the Regulation on Genetically Modified Organisms in a Step by Step Approach. *Potato Research* **51**: 75–88.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., et al.** (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**: 463–467.

- Jansen, R.K., Kaittani, C., Saski, C., Lee, S.-B., Tomkins, J., Alverson, A.J., and Daniell, H.** (2006). Phylogenetic analyses of *Vitis* (*Vitaceae*) based on complete chloroplast genome sequences: effects of taxon sampling and phylogenetic methods on resolving relationships among rosids. *BMC Evolutionary Biology* **6**: 32.
- Janzac, B., Fabre, F., Palloix, A., and Moury, B.** (2009). Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Molecular Plant Pathology* **10**: 599–610.
- Jelenkovic, G. and Olmo, H.** (1968). Cytogenesis of *Vitis*. *Vitis* **7**: 281–293.
- Jensen, B.D., Hockenhull, J., and Munk, L.** (1999). Seedling and adult plant resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower (*Brassica oleracea* convar. botrytis var. botrytis). *Plant Pathology* **48**: 604–612.
- Jeuken, M. and Lindhout, P.** (2002). *Lactuca saligna*, a non-host for lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*), harbors a new race-specific *Dm* gene and three QTLs for resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **105**: 384–391.
- Jeuken, M., Pelgrom, K., Stam, P., and Lindhout, P.** (2008). Efficient QTL detection for nonhost resistance in wild lettuce: backcross inbred lines versus F2 population. *Theoretical and Applied Genetics* **116**: 845–857.
- Jeuken, M.J.W. and Lindhout, P.** (2004). The development of lettuce backcross inbred lines (BILs) for exploitation of the *Lactuca saligna* (wild lettuce) germplasm. *Theoretical And Applied Genetics* **109**: 394–401.
- Johnson, R.** (1981). Durable resistance: Definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology* **71**: 567–568.
- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J., and Jones, J.D.** (1994). Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266**: 789–793.
- Jones, J.D.G.** (2001). Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 281–287.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Jung, S., Cho, I., Sosinski, B., Abbott, A., and Main, D.** (2010). Comparative genomic sequence analysis of strawberry and other rosids reveals significant microsynteny. *BMC Research Notes* **3**: 168.
- Jung, S., Jiwan, D., Cho, I., Lee, T., Abbott, A., Sosinski, B., and Main, D.** (2009). Synteny of *Prunus* and other model plant species. *BMC Genomics* **10**: 76.
- Jørgensen, J.** (1992). Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* **63**: 141–152.
- Kajava, A. V** (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *Journal of Molecular Biology* **277**: 519–527.
- Kamoun, S.** (2003). Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell* **2**: 191–199.
- Kang, S.-T. and Mian, M.A.R.** (2010). Genetic map of the powdery mildew resistance gene in soybean PI 243540. *Genome National Research Council Canada* **53**: 400–405.
- Kao, C.H., Zeng, Z.B., and Teasdale, R.D.** (1999). Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* **152**: 1203–1216.
- Kenigsbuch, D. and Cohen, Y.** (1992). Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo* PI 124112 and commonality of resistance genes with PI 124111F. *Plant Disease* **76**: 615–617.
- Khatib, M., Lafitte, C., Esquerre-Tugaye, M.-T., Bottin, A., and Rickauer, M.** (2004). The CBEL elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* activates

- defence in *Arabidopsis thaliana* via three different signalling pathways. *New Phytologist* **162**: 501–510.
- Kim, S., Song, Y.H., Lee, J.-Y., Choi, S.R., Dhandapani, V., Jang, C.S., Lim, Y.P., and Han, T.** (2011). Identification of the BrRHP1 locus that confers resistance to downy mildew in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) and development of linked molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* **123**: 1183–1192.
- Kirchheimer, F.** (1939). Rhamnales I: Vitaceae. In W. Jongmans [ed.], *Fossilium catalogus II: Plantae*. Dr. W. Junk, Verlag fur Naturwissenschaften, 's-Gravenhage, Netherland.
- Kobayashi, S., Goto-yamamoto, N., and Hirochika, H.** (2004). Mutations in Grape Skin Color. *Science* **304**: 982.
- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K., and Honda, C.** (2002). Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* **215**: 924–933.
- Kobe, B. and Kajava, A. V.** (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology* **11**: 725–732.
- Kooistra, E.** (1968). Powdery mildew resistance in cucumber. *Euphytica* **17**: 236–244.
- Kortekamp, A.** (1997). *Epicoccum nigrum* Link : A biological control agent of *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et De Toni? *Vitis* **36**: 215–216.
- Kosambi, D.** (1944). The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* **12**: 172–175.
- Kostiner, D.R., Nguyen, H., Cox, V.A., and Cotter, P.D.** (2002). Stabilization of a terminal inversion duplication of 8p by telomere capture from 18q. *Cytogenetic and Genome Research* **98**: 9–12.
- Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeier, W., Singh, R.P., Huerta-espino, J., Mcfadden, H., Bossolini, E., Selter, L.L., and Keller, B.** (2009). Pathogens in Wheat. *Science* **323**: 1360–1363.
- Ku, H.-M., Vision, T., Liu, J., and Tanksley, S.D.** (2000). Comparing sequenced segments of the tomato and *Arabidopsis* genomes: Large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 9121–9126.
- Kuang, H., Woo, S.-S., Meyers, B.C., Nevo, E., and Michelmore, R.W.** (2004). Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce. *The Plant Cell* **16**: 2870–2894.
- Kumar, H. and Singh, R.B.** (1981). Genetic analysis of adult plant resistance to powdery mildew in peas (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* **30**: 147–151.
- Lander, E.S. and Botstein, D.** (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**: 185–199.
- Landry, B.S., Kesseli, R. V, Farrara, B., and Michelmore, R.W.** (1987). A Genetic Map of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) with Restriction Fragment Length Polymorphism, Isozyme, Disease Resistance and Morphological Markers. *Genetics* **116**: 331–7.
- Latijnhouwers, M., De Wit, P.J.G.M., and Govers, F.** (2003). Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology* **11**: 462–469.
- Lebeda, A. and Schwinn, F.J.** (1994). The downy mildews - an overview of recent research progress. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **101**: 225–254.
- Lehmann, E.** (1975). *Nonparametrics*. McGraw-Hill, New York, NY.

- Leister, D.** (2004). Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance gene. *Trends in Genetics* **20**: 116–122.
- Levadoux, L.** (1956). Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. *Annales de l'Amélioration des Plantes* **6**: 59–118.
- Li, C., Faino, L., Dong, L.I.N., Fan, J., Kiss, L., Giovanni, C.D.E., Lebeda, A., Scott, J., Matsuda, Y., Toyoda, H., Lindhout, P.I.M., Visser, R.G.F., Bonnema, G., and Bai, Y.** (2012). Characterization of polygenic resistance to powdery mildew in tomato at cytological, biochemical and gene expression level. *Molecular Plant Pathology* **13**: 148–159.
- Li, H. and Doazan, J.** (1986). Evaluation de différences de sensibilité au mildiou (*Plasmopara viticola*) entre cépages de *Vitis vinifera*. Analyse préliminaire de deux descendance. IV<sup>ème</sup> Symp. Intern. Génétique Vigne, Vérone, Italie, 13- 18 Avril 1985. *Vignevini*. **13**: 160–163.
- Lijavetzky, D., Ruiz-García, L., Cabezas, J.A., De Andrés, M.T., Bravo, G., Ibáñez, A., Carreño, J., Cabello, F., Ibáñez, J., and Martínez-Zapater, J.M.** (2006). Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Molecular Genetics and Genomics* **276**: 427–435.
- Lillemo, M., Asalf, B., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., Chen, X.M., He, Z.H., and Bjørnstad, A.** (2008). The adult plant rust resistance loci Lr34/Yr18 and Lr46/Yr29 are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. *Theoretical And Applied Genetics* **116**: 1155–1166.
- Lin, C., Mueller, L.A., Carthy, J.M., Crouzillat, D., Pétiard, V., and Tanksley, S.D.** (2005). Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theoretical and applied genetics* **112**: 114–130.
- Liu, S., Griffey, C., and Saghai Maroof, M.** (2001). Identification of Molecular Markers Associated with Adult Plant Resistance to Powdery Mildew in Common Wheat Cultivar Massey. *Crop Science* **41**: 1268–1275.
- Liu, Z., Gulya, T.J., Seiler, G.J., Vick, B. a, and Jan, C.-C.** (2012). Molecular mapping of the *Pl(16)* downy mildew resistance gene from HA-R4 to facilitate marker-assisted selection in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* **125**: 121–131.
- Livingstone, K.D., Lackney, V.K., Blauth, J.R., Van Wijk, R., and Jahn, M.K.** (1999). Genome mapping in capsicum and the evolution of genome structure in the *Solanaceae*. *Genetics* **152**: 1183–1202.
- Lodhi, M.A., Daly, M.J., Ye, G.N., Weeden, N.F., and Reisch, B.I.** (1995). A molecular marker based linkage map of *Vitis*. *Genome National Research Council Canada* **38**: 786–794.
- Lohnes, D. and Bernard, R.** (1992). Inheritance of resistance to powdery mildew in soybeans. *Plant disease* **76**: 964–965.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A., and Pieterse, C.M.** (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 453–483.
- Lorieux, M.** (1994). Aspects statistiques de la cartographie des marqueurs moléculaires. Document de travail de la mission de la mission biométrie du CIRAD **1-94**: 31–35.
- Lowe, K.M. and Walker, M. a** (2006). Genetic linkage map of the interspecific grape rootstock cross Ramsey (*Vitis champinii*) x Riparia Gloire (*Vitis riparia*). *Theoretical and Applied Genetics* **112**: 1582–1592.
- Lu, J., Lamikanra, O., Science, V., and Florida, A.** (1996). Barriers to Intersubgeneric Crosses between *Muscadinia* and *Euvitis*. *Horticultural Science* **31**: 269–271.

- Luo, M.C., Deal, K.R., Akhunov, E.D., Akhunova, A.R., Anderson, O.D., Anderson, J.A., Blake, N., Clegg, M.T., Coleman-Derr, D., Conley, E.J., Crossman, C.C., Dubcovsky, J., Gill, B.S., Gu, Y.Q., Hadam, J., Heo, H.Y., Huo, N., Lazo, G., Ma, Y., Matthews, D.E., *et al.* (2009). Genome comparisons reveal a dominant mechanism of chromosome number reduction in grasses and accelerated genome evolution in *Triticeae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 15780–15785.
- Lysak, M.A., Koch, M.A., Pecinka, A., and Schubert, I. (2005). Chromosome triplication found across the tribe *Brassicaceae*. *Genome research* **15**: 516–525.
- Ma, H., Kong, Z., Fu, B., Li, N., Zhang, L., Jia, H., and Ma, Z. (2011). Identification and mapping of a new powdery mildew resistance gene on chromosome 6D of common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **123**: 1099–1106.
- Mago, R., Tabe, L., McIntosh, R. a, Pretorius, Z., Kota, R., Paux, E., Wicker, T., Breen, J., Lagudah, E.S., Ellis, J.G., and Spielmeier, W. (2011). A multiple resistance locus on chromosome arm 3BS in wheat confers resistance to stem rust (Sr2), leaf rust (Lr27) and powdery mildew. *Theoretical and Applied Genetics* **123**: 615–623.
- Mahajan, V., Gills, H., and More, T. (1995). Inheritance of downy mildew resistance in indian cauliflower (group III). *European Journal of Plant Pathology* **86**: 1–3.
- Mano, Y., Omori, F., Muraki, M., and Takamizo, T. (2005). QTL mapping of adventitious root formation under flooding conditions in tropical maize (*Zea mays L.*) seedlings. *Breeding Science* **55**: 343–347.
- Marguerit, E., Boury, C., Manicki, A., Donnart, M., Butterlin, G., Némorin, A., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Ollat, N., and Decroocq, S. (2009). Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* **118**: 1261–1278.
- Marino, R., Sevini, F., Madini, A., Vecchione, A., Pertot, I., Dalla Serra, A., Versini, G., Velasco, R., and Grando, M. (2003). QTL mapping for disease resistance and fruit quality in grape. *Acta Horticulturae* **603**: 527–533.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J., and Sessa, G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 23–61.
- Martinez, V.A., Hill, W.G., and Knott, S.A. (2002). On the use of double haploids for detecting QTL in outbred populations. *Heredity* **88**: 423–431.
- Mazourek, M., Cirulli, E.T., Collier, S.M., Landry, L.G., Kang, B.-C., Quirin, E. a, Bradeen, J.M., Moffett, P., and Jahn, M.M. (2009). The fractionated orthology of *Bs2* and *Rx/Gpa2* supports shared synteny of disease resistance in the *Solanaceae*. *Genetics* **182**: 1351–1364.
- McDonald, B. a and Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349–379.
- McDowell, J.M., Dhandaydham, M., Long, T. a, Aarts, M.G., Goff, S., Holub, E.B., and Dangl, J.L. (1998). Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**: 1861–1874.
- McDowell, J.M. and Woffenden, B.J. (2003). Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology* **21**: 178–183.
- McGovern, P.E. (2003). *Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture* P.U. Press, ed (Princeton University Press).
- Merdinoglu, D., Butterlin, G., Bevilacqua, L., Chiquet, V., Adam-Blondon, A.-F., and Decroocq, S. (2005). Development and characterization of a large set of



- microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Molecular Breeding* **15**: 349–366.
- Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Coste, P., Dumas, V., Haetty, S., and Butterlin, G.** (2003). Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Horticulturae* **603**: 451–456.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R.W.** (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**: 809–834.
- Miazzi, M., Hajjeh, H., and Faretra, F.** (2003). Observations on the population biology of the grape powdery mildew fungus *Uncinula necator*. *Journal of Plant Pathology* **85**: 123–129.
- Michelmore, R.W.** (2000). Genomic approaches to plant disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 125–131.
- Michelmore, R.W. and Meyers, B.C.** (1998). Selection and a Birth-and-Death Process Clusters of Resistance Genes in Plants Evolve by Divergent Selection and a Birth-and-Death Process. *Genome Research* **8**: 1113–1130.
- Miclot, A.-S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Duchêne, E., Merdinoglu, D., and Mestre, P.** (2011). A standardised method for the quantitative analysis of resistance to grapevine powdery mildew. *European Journal of Plant Pathology* **133**: 483–495.
- Miranda, L.M., Murphy, J.P., Marshall, D., and Leath, S.** (2006). Pm34: a new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* Coss. to common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical And Applied Genetics* **113**: 1497–1504.
- Mondragon-Palomino, M. and Gaut, B.S.** (2005). Gene conversion and the evolution of three leucine-rich repeat gene families in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 2444–2456.
- Monosi, B., Wisser, R.J., Pennill, L., and Hulbert, S.H.** (2004). Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 1434–1447.
- Montarry, J., Cartolaro, P., Delmotte, F., Jolivet, J., and Willocquet, L.** (2008). Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during grapevine powdery mildew epidemics. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 6327–6332.
- Monteiro, A.A., Coelho, P.S., Bahcevandziev, K., and Valrio, L.** (2005). Inheritance of downy mildew resistance at cotyledon and adult-plant stages in “Couve Algarvia” (*Brassica oleracea* var. *trunchuda*). *Euphytica* **141**: 85–92.
- Moreira, F.M., Madini, A., Marino, R., Zulini, L., Stefanini, M., Velasco, R., Kozma, P., and Grando, M.S.** (2010). Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genetics & Genomes* **7**: 153–167.
- Morishita, M., Sugiyama, K., and Saito, T.** (2003). Powdery Mildew Resistance in Cucumber. *Japan Agricultural Research Quarterly* **37**: 7–14.
- Moroldo, M., Paillard, S., Marconi, R., Fabrice, L., Canaguier, A., Cruaud, C., De Berardinis, V., Guichard, C., Brunaud, V., Le Clainche, I., Scalabrin, S., Testolin, R., Di Gaspero, G., Morgante, M., and Adam-Blondon, A.-F.** (2008). A physical map of the heterozygous grapevine “Cabernet Sauvignon” allows mapping candidate genes for disease resistance. *BMC Plant Biology* **8**: 66.
- Mudge, J., Cannon, S.B., Kalo, P., Oldroyd, G.E., Roe, B.A., Town, C.D., and Young, N.D.** (2005). Highly syntenic regions in the genomes of soybean, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **5**: 15.

- Mullins, M.G., Bouquet, A., and Williams, L.E.** (1992). The Biology of the Grapevine. Cambridge University, NY, USA.
- Mulpuri, S., Liu, Z., Feng, J., Gulya, T.J., and Jan, C.-C.** (2009). Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, *Pl(13)*, in cultivated sunflower (*Helianthus annuus L.*). Theoretical and Applied Genetics **119**: 795–803.
- Murat, F., Xu, J.-H., Tannier, E., Abrouk, M., Guilhot, N., Pont, C., Messing, J., and Salse, J.** (2010). Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. Genome Research **20**: 1545–1557.
- Musetti, R., Vecchione, A., Stringher, L., Borselli, S., Zulini, L., Marzani, C., D'Ambrosio, M., Di Toppi, L.S., and Pertot, I.** (2006). Inhibition of Sporulation and Ultrastructural Alterations of Grapevine Downy Mildew by the Endophytic Fungus *Alternaria alternata*. Phytopathology **96**: 689–698.
- Müller, K. and Black, W.** (1952). Potato breeding for resistance to blight and virus diseases during the last hundred year. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung **31**: 305–318.
- Nair, S.K., Prasanna, B.M., Garg, A., Rathore, R.S., Setty, T.A.S., and Singh, N.N.** (2005). Identification and validation of QTLs conferring resistance to sorghum downy mildew (*Peronosclerospora sorghi*) and Rajasthan downy mildew (*P. heteropogoni*) in maize. Theoretical And Applied Genetics **110**: 1384–1392.
- Nie, Z.-L., Sun, H., Chen, Z.-D., Meng, Y., Manchester, S.R., and Wen, J.** (2010). Molecular phylogeny and biogeographic diversification of *Parthenocissus* (*Vitaceae*) disjunct between Asia and North America. American Journal of Botany **97**: 1342–1353.
- Niks, R.E. and Marcel, T.C.** (2009). Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? New Phytologist **182**: 817–828.
- Niu, X.-K., Leung, H., and Williams, P.** (1983). Sources and nature of resistance to downy mildew and turnip mosaic in Chinese cabbage. Journal of American Society for Horticultural Science **108**: 775–778.
- Núñez, Y., Gallego, J., Ponz, F., and Raposo, R.** (2006). Analysis of population structure of *Erysiphe necator* using AFLP markers. Plant Pathology **55**: 650–656.
- Olczak-Woltman, H., Marcinkowska, J., and Niemirowicz-Szczytt, K.** (2011). The genetic basis of resistance to downy mildew in *Cucumis* spp.-latest developments and prospects. Journal of Applied Genetics **52**: 249–255.
- Olien, W.** (1990). The muscadine grape: botany, viticulture, history, and current industry. Horticultural Science **25**: 732–739.
- Olmo, H.** (1976). Grapes. In Simmonds NW (ed) Evolution of crop plants. Longman, London, pp. 294–298.
- Olmo, H.** (1986). The potential role of (*vinifera* x *rotundifolia*) hybrids in grape variety improvements. Experientia **42**: 921–926.
- Olmo, H.** (1971). *Vinifera* x *rotundifolia* hybrids as wine grapes. American Journal of Enology and Viticulture **22**: 87–91.
- Van Ooijen, J.** (2009). MapQTL 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Wageningen, the Netherlands: Kyazma B. V.
- Van Ooijen, J. and Voorrips, R.** (2001). JoinMap version 3.0 : software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen: Plant Research International.

- Palloix, A., Ayme, V., and Moury, B.** (2009). Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *The New phytologist* **183**: 190–199.
- Panstruga, R.** (2005). Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi. *Biochemical Society Transactions* **33**: 389–392.
- Panstruga, R. and Dodds, P.N.** (2009). Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science* **324**: 748–750.
- Parker, J.E., Coleman, M.J., Szabò, V., Frost, L.N., Renate, S., Biezen, E.A. Van Der, Moores, T., Dean, C., Daniels, M.J., and Jonesal, J.D.G.** (1997). The *Arabidopsis* Downy Mildew Resistance Gene *RPP5* Shares Similarity to the Toll and Interleukin-I Receptors with N and L6. *The Plant cell* **9**: 879–894.
- Parkin, I.A.P., Gulden, S.M., Sharpe, A.G., Lukens, L., Trick, M., Osborn, T.C., and Lydiate, D.J.** (2005). *Arabidopsis/Brassica napus* comparative map. *Genetics*.
- Patel, G. and Olmo, H.** (1955). Cytogenetics of *Vitis*: I. The Hybrid *V. vinifera* × *V. rotundifolia*. *American Journal of Botany* **42**: 141–159.
- Pauquet, J., Bouquet, A., This, P., and 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.
- Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R.G.F., and Bai, Y.** (2010). Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding* **25**: 1–12.
- Pavan, S., Schiavulli, A., Appiano, M., Marcotrigiano, A.R., Cillo, F., Visser, R.G.F., Bai, Y., Lotti, C., and Ricciardi, L.** (2011). Pea powdery mildew er1 resistance is associated to loss-of-function mutations at a *MLO* homologous locus. *Theoretical and Applied Genetics* **123**: 1425–1431.
- Pearson, R. and Goheen, A.** (1988). *Compendium of grape diseases*. 1st ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Perchepped, L., Bardin, M., Dogimont, C., and Pitrat, M.** (2005). and Powdery Mildew Resistance in Melon Assessed by Quantitative Trait Loci Mapping. *Phytopathology* **95**: 556–565.
- Peressotti, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., Delmotte, F., Bellin, D., Di Gaspero, G., Testolin, R., Merdinoglu, D., and Mestre, P.** (2010). Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biology* **10**: 147.
- Phan, H.T.T., Ellwood, S.R., Hane, J.K., Ford, R., Materne, M., and Oliver, R.P.** (2007). Extensive macrosynteny between *Medicago truncatula* and *Lens culinaris* ssp. *culinaris*. *Theoretical and Applied Genetics* **114**: 549–58.
- Pink, D., Bailey, L., McClement, S., Hand, P., Mathas, E., Buchanan-Wollaston, V., Astley, D., King, G., and Teakle, G.R.** (2008). Double haploids, markers and QTL analysis in vegetable brassicas. *Euphytica* **164**: 509–514.
- Pitrat, M.** (1991). Linkage Groups In *Cucumis-Melo L.* *Journal of Heredity* **82**: 406–411.
- Pivovarov, V.** (1998). Cucumber breeding for general adaptive ability and resistance to diseases. In: *Cucurbitaceae 88*. Proceedings of the Eucarpia meeting on cucurbit genetics and breeding, Avignon-Montfavet. 69–74.
- Planchon, J.** (1887). Monographie des Ampélicées vrais. In A. F. P. P. De Candolle and C. De Candolle [eds.], *Monographiae Phanaerogamarum* 5(2). G. Masson, Paris, France., pp. 305–654.

- Polzin, K.M., Lohnes, D.G., Nickell, C.D., and Shoemaker, R.C.** (1994). Integration of *Rps2*, *Rmd*, and *Rj2* into Linkage Group-J of the Soybean Molecular Map. *Journal of Heredity* **85**: 300–303.
- Périn, C., Hagen, S., De Conto, V., Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Portnoy, V., Baudracco-Arnas, S., Chadoeuf, J., Dogimont, C., and Pitrat, M.** (2002). A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *Theoretical And Applied Genetics* **104**: 1017–1034.
- Péros, J.-P., Troulet, C., Guerriero, M., Michel-Romiti, C., and Notteghem, J.-L.** (2005). Genetic Variation and Population Structure of the Grape Powdery Mildew Fungus, *Erysiphe necator*, in Southern France. *European Journal of Plant Pathology* **113**: 407–416.
- Qi, Y., Tsuda, K., Glazebrook, J., and Katagiri, F.** (2011). Short communication Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology* **12**: 702–708.
- Qiu, D., Gao, M., Li, G., and Quiros, C.** (2009). Comparative sequence analysis for *Brassica oleracea* with similar sequences in *B. rapa* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports* **28**: 649–661.
- Rahim, M., Jan, C.C., and Gulya, T.J.** (2002). Inheritance of resistance to sunflower downy mildew races 1, 2 and 3 in cultivated sunflower. *Plant Breeding* **121**: 57–60.
- Ramming, D.W., Gabler, F., Smilanick, J., Cadle-Davidson, M., Barba, P., Mahanil, S., and Cadle-Davidson, L.** (2011). A single dominant locus, *ren4*, confers rapid non-race-specific resistance to grapevine powdery mildew. *Phytopathology* **101**: 502–508.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M., and Baulcombe, D.C.** (2001). Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* **25**: 237–245.
- Reglinski, T., Elmer, P. a. G., Taylor, J.T., Wood, P.N., and Hoyte, S.M.** (2010). Inhibition of *Botrytis cinerea* growth and suppression of botrytis bunch rot in grapes using chitosan. *Plant Pathology* **59**: 882–890.
- Regner, F., Hack, R., and Santiago, J.L.** (2006). Highly variable *Vitis* microsatellite loci for the identification of Pinot Noir clones. *Vitis* **45**: 85–91.
- Reinink, K.** (1999). Lettuce resistance breeding. Lebeda, A. and Kristkova, E. (eds): *Eucarpia Leafy Vegetables '99*. Palacky University, Olomouc: 139–147.
- Riaz, S., Dangl, G.S., Edwards, K.J., and Meredith, C.P.** (2004). A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera L.* *Theoretical And Applied Genetics* **108**: 864–872.
- Riaz, S., Hu, R., and Walker, M. a** (2012). A framework genetic map of *Muscadinia rotundifolia*. *Theoretical and Applied Genetics* **125**: 1195–1210.
- Riaz, S., Tenschler, A., Ramming, D., and Walker, M.** (2011). Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theoretical and Applied Genetics* **122**: 1059–1073.
- Ribaut, J.-M. and Hoisington, D.** (1998). Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends in Plant Science* **3**: 236–239.
- Richter, T.E. and Ronald, P.C.** (2000). The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Biology* **42**: 195–204.
- Rieger, M.** (2006). *Introduction to fruit crops*, Haworth Press.
- Robinson, A.** (2007). *Crop histories*, Sharebooks Publishing.

- Ron, M. and Avni, A.** (2004). The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. *The Plant cell* **16**: 1604–1615.
- Rossetto, M., McNally, J., and Henry, R.J.** (2002). Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the *Vitaceae*. *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 61–66.
- Rousseaux, M.C., Jones, C.M., Adams, D., Chetelat, R., Bennett, A., and Powell, A.** (2005). QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theoretical And Applied Genetics* **111**: 1396–1408.
- Rowell, D.M., Rockman, M. V, and Tait, N.N.** (2002). Extensive Robertsonian rearrangement: implications for the radiation and biogeography of Planipapillus Reid (Onychophora: Peripatopsidae). *Journal of Zoology* **257**: 171–179.
- Rumbolz, J., Kassemeyer, H.-H., Steinmetz, V., Deising, H.B., Mendgen, K., Mathys, D., Wirtz, S., and Guggenheim, R.** (2000). Differentiation of infection structures of the powdery mildew fungus *Uncinula necator* and adhesion to the host cuticle. *Canadian Journal of Botany* **78**: 409–421.
- Salmaso, M., Malacarne, G., Troglio, M., Faes, G., Stefanini, M., Grando, M.S., and Velasco, R.** (2008). A grapevine (*Vitis vinifera L.*) genetic map integrating the position of 139 expressed genes. *Theoretical and Applied Genetics* **116**: 1129–1143.
- Salse, J., Abrouk, M., Murat, F., Quraishi, U.M., and Feuillet, C.** (2009). Improved criteria and comparative genomics tool provide new insights into grass paleogenomics. *Briefings in bioinformatics* **10**: 619–630.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A.** (1990). The P-loop, a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **15**: 430–434.
- Scala, P.B.** (2012). Une nouvelle espèce de papillon qui s'attaque aux vignes. *Futura Sciences*: 1–2.
- Schaerer, H., Amsler, T., Thürig, B., and Tamm, L.** (2006). Efficacy testing of novel organic fungicides and elicitors: from the lab to the field. Paper at: Joint Organic Congress, Odense, Denmark, May 30-31, 2006.
- Schubert, I. and Lysak, M. a** (2011). Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics* **27**: 207–216.
- Schubert, I., Rieger, R., and Fuchs, J.** (1995). Alteration of basic chromosome number by fusion-fission cycles. *Genome National Research Council Canada Genome Conseil national de recherches Canada* **38**: 1289–1292.
- Schwander, F., Eibach, R., Fechter, I., Hausmann, L., Zyprian, E., and Töpfer, R.** (2012). *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* **124**: 163–176.
- Seeholzer, S., Tsuchimatsu, T., Jordan, T., Bieri, S., Pajonk, S., Yang, W., Jahoor, A., Shimizu, K.K., Keller, B., and Schulze-Lefert, P.** (2010). Diversity at the *Mla* powdery mildew resistance locus from cultivated barley reveals sites of positive selection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 497–509.
- Sefc, K.M., Regner, F., Turetschek, E., Glössl, J., and Steinkellner, H.** (1999). Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* **42**: 367–373.
- Seifi, A., Kaloshian, I., Vossen, J., Che, D., Bhattarai, K.K., Fan, J., Naher, Z., Goverse, A., Tjallingii, W.F., Lindhout, P., Visser, R.G.F., and Bai, Y.** (2011). Linked, if not the same, *Mi-1* homologues confer resistance to tomato powdery mildew and root-knot nematodes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 441–450.

- Sessitsch, a, Coenye, T., Sturz, a V, Vandamme, P., Barka, E.A., Salles, J.F., Van Elsas, J.D., Faure, D., Reiter, B., Glick, B.R., Wang-Pruski, G., and Nowak, J.** (2005). *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 1187–1192.
- Shimizu, S., Kanazawa, A., and Kato, A.** (1983). Studies on the breeding of cucumber for resistance to downy mildew. Part 2. Difference of resistance to downy mildew among the cucumber varieties and the utility of the cucumber variety resistance to downy mildew (in Japanese). *Bulletin Horticultural Research Station, Japan* **2**: 80–81.
- Simon, M., Loudet, O., Durand, S., Bérard, A., Brunel, D., Sennesal, F.-X., Durand-Tardif, M., Pelletier, G., and Camilleri, C.** (2008). Quantitative Trait Loci Mapping in Five New Large Recombinant Inbred Line Populations of *Arabidopsis thaliana* Genotyped With Consensus Single-Nucleotide Polymorphism Markers. *Genetics* **178**: 2253–2264.
- Sinapidou, E., Williams, K., Nott, L., Bahkt, S., Tör, M., Crute, I., Bittner-Eddy, P., and Beynon, J.** (2004). Two TIR:NB:LRR genes are required to specify resistance to *Peronospora parasitica* isolate Cala2 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **38**: 898–909.
- Skiba, B., Ford, R., and Pang, E.C.K.** (2004). Construction of a linkage map based on a *Lathyrus sativus* backcross population and preliminary investigation of QTLs associated with resistance to ascochyta blight. *Theoretical And Applied Genetics* **109**: 1726–1735.
- Slusarenko, A.J. and Schlaich, N.L.** (2003). Downy mildew of *Arabidopsis thaliana* caused by *Hyaloperonospora parasitica* (formerly *Peronospora parasitica*). *Molecular Plant Pathology* **4**: 159–170.
- Small, J.** (1913). *Flora of the Southeastern United States*, 2nd edn. The Author, New York.
- Soejima, A. and Wen, J.** (2006). Phylogenetic analysis of the grape family (*Vitaceae*) based on three chloroplast makers. *American Journal of Botany* **93**: 278–287.
- Solomon-Blackburn, R., Stewart, H., and Bradshaw, J.** (2007). Distinguishing major-gene from field resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) and selecting for high levels of field resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **115**: 141–149.
- Somssich, I.E. and Hahlbrock, K.** (1998). Pathogen defence in plants- a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* **3**: 86–90.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C., and Ronald, P.** (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* **270**: 1804–1806.
- Spencer, D.** (1981). *The Downy mildews*, Academic Press, London.
- Spielmeier, W., McIntosh, R.A., Kolmer, J., and Lagudah, E.S.** (2005). Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **111**: 731–735.
- Staudt, G. and Kassemeyer, H.H.** (1995). Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. *Vitis* **34**: 225–228.
- Stebbins, G.** (1958). The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. *Advances in Genetics* **9**: 147–215.

- Stein, U., Heintz, C., and Blaich, R.** (1985). The in vitro examination of grapevines regarding resistance to powdery and downy mildew. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **94**: 355–369.
- Steva, H. and Clerjeau, M.** (1990). Cross resistance to sterol biosynthesis inhibitor fungicides in strains of *Uncinula necator* isolated in France and Portugal. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* **55**: 983–988.
- Stummer, B. and Scott, E.** (2003). Detection of novel genotypes in progeny from a controlled cross between isolates of *Uncinula necator* belonging to distinct phenetic groups. *Australasian Plant Pathology* **32**: 213–218.
- Szalma, S.J., Hostert, B.M., Ledeaux, J.R., Stuber, C.W., and Holland, J.B.** (2007). QTL mapping with near-isogenic lines in maize. *Theoretical And Applied Genetics* **114**: 1211–1228.
- Takayama, S. and Isogai, A.** (2005). Self-Incompatibility in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 467–489.
- Taler, D., Galperin, M., Benjamin, I., Cohen, Y., and Kenigsbuch, D.** (2004). Plant *eR* genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. *The Plant Cell* **16**: 172–184.
- Tan, A., Hutten, R., Visser, R., and Van Eck, H.** (2010). The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes *RPi-mcd1* and *RPi-ber* in potato. *Theoretical and Applied Genetics* **121**: 117–125.
- Tanksley, S.D., Ganai, M.W., Prince, J.P., De Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., and Martin, G.B.** (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132**: 1141–1160.
- Tao, Y., Yuan, F., Leister, R.T., Ausubel, F.M., and Katagiri, F.** (2000). Mutational analysis of the Arabidopsis nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene *RPS2*. *The Plant Cell* **12**: 2541–2554.
- Teixeira, A.P.M., Barreto, F.A.D.S., and Camargo, L.E.A.** (2008). An AFLP marker linked to the *Pm-1* gene that confers resistance to *Podosphaera xanthii* race 1 in *Cucumis melo*. *Genetics and Molecular Biology* **31**: 547–550.
- The Liberty Hyde Bailey Hortorium** (1976). *Hortus Third, A Concise Dictionary of Plants Cultivated in The United States and Canada* MacMillan, New York.
- Thiel, T., Graner, A., Waugh, R., Grosse, I., Close, T.J., and Stein, N.** (2009). Evidence and evolutionary analysis of ancient whole-genome duplication in barley predating the divergence from rice. *BMC Evolutionary Biology* **9**: 209.
- This, P., Lacombe, T., Cadle-Davidson, M., and Owens, C.L.** (2007). Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. *Theoretical and Applied Genetics* **114**: 723–730.
- This, P., Lacombe, T., and Thomas, M.R.** (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* **22**: 511–519.
- Thomas, C.** (1988). Physiological specialization in downy and powdery mildews of cucurbit. In “Cucurbitaceae 88”. G. Risser and M. Pitrat, eds. Avignon, France.
- Thomas, M.R. and Scott, N.S.** (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical And Applied Genetics* **86**: 985–990.
- Thomma, B.P.H.J., Nürnberger, T., and Joosten, M.H. a J.** (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant cell* **23**: 4–15.
- Tiwari, K.R., Penner, G.A., and Warkentin, T.D.** (1997). Inheritance of powdery mildew resistance in pea. *Canadian Journal of Plant Science* **36**: 1–5.

- Tran Manh Sung, C., Strizyk, C., and Clerjeau, M.** (1990). Simulation of the date of maturity of *Plasmopara viticola* oospores to predict the severity of primary infections in grapevine. *Plant Disease* **74**: 120–124.
- Troggio, M., Malacarne, G., Coppola, G., Segala, C., Cartwright, D. a, Pindo, M., Stefanini, M., Mank, R., Moroldo, M., Morgante, M., Grando, M.S., and Velasco, R.** (2007). A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs. *Genetics* **176**: 2637–2650.
- Tröndle, D., Schröder, S., Kassemeyer, H.-H., Kiefer, C., Koch, M. a, and Nick, P.** (2010). Molecular phylogeny of the genus *Vitis* (*Vitaceae*) based on plastid markers. *American Journal of Botany* **97**: 1168–1178.
- Tsubokura, Y., Onda, R., Sato, S., Xia, Z., Hayashi, M., Fukushima, Y., Tabata, S., and Harada, K.** (2008). Characterization of soybean genome based on synteny analysis with *Lotus japonicus*. *Breeding Science* **58**: 157–167.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F.** (2009). Network Properties of Robust Immunity in Plants. *PLoS genetics* **5**: 16.
- Tsujimoto, H., Usami, N., Hasegawa, K., Yamada, T., Nagaki, K., and Sasakuma, T.** (1999). De novo synthesis of telomere sequences at the healed breakpoints of wheat deletion chromosomes. *Molecular General Genetics* **262**: 851–856.
- Turkensteen, L.J.** (1993). Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. In *Durability of Disease Resistance*, T. Jacobs and J.E. Parlevliet, eds (Kluwer Academic Publishers), pp. 115–124.
- Tör, M., Brown, D., Cooper, A., Woods-Tör, A., Sjölander, K., Jones, J.D.G., and Holub, E.B.** (2004). Arabidopsis downy mildew resistance gene *RPP27* encodes a receptor-like protein similar to *CLAVATA2* and tomato *Cf-9*. *Plant Physiology* **135**: 1100–1112.
- Vaid, A. and Tyagi, P.** (1997). Genetics of powdery mildew resistance in pea. *Euphytica* **96**: 203–206.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D. a, Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., Fitzgerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T., Facci, M., Mitchell, J.T., Perazzolli, M., Eldredge, G., et al.** (2007). A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PloS one* **2**: e1326.
- Verderevskij, D., Varomc, K., and Filatova, J.** (1965). A study of the susceptibility to mildew of varieties from the ampelographic collection of the European grape. *Sadovod. Vinogradar. Vinodel. Moldavii* **7**: 46–47.
- Viennot-Bourgin, G.** (1949). *Les champignons parasites des plantes cultivées*. Tome I.
- Vilanova, S., Sargent, D.J., Arús, P., and Monfort, A.** (2008). Synteny conservation between two distantly-related *Rosaceae* genomes: *Prunus* (the stone fruits) and *Fragaria* (the strawberry). *BMC plant biology* **8**: 67.
- Viret, O., Bloesch, B., Tailens, J., Siegfried, W., and Dupuis, D.** (2001). Prévision et gestion des infections du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) à l'aide d'une station d'avertissement. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture et Horticulture* **33**: I–XII.
- Van Vliet, G. and Meysing, W.** (1974). Inheritance of resistance to *Pseudoperonospora cubensis* Rost. in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica* **23**: 251–255.
- Wan, Y., Schwaninger, H., He, P., and Wang, Y.** (2007). Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. *Vitis* **46**: 132–136.
- Wang, M., Allefs, S., Van Den Berg, R.G., Vleeshouwers, V.G.A.A., Van Der Vossen, E.A.G., and Vosman, B.** (2008). Allele mining in Solanum: conserved



- homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. Theoretical And Applied Genetics **116**: 933–943.
- Wang, Y., Liu, Y., He, P., Chen, J., Lamikanra, O., and Lu, J.** (1995). Evaluation of foliar resistance to *Uncinula necator* in Chinese wild *Vitis* species. *Vitis* **34**: 159–164.
- Waterhouse, P.M. and Helliwell, C.A.** (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics* **4**: 29–38.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., and Beer, S. V** (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**: 85–88.
- Weller, J.** (1987). Mapping and analysis of quantitative trait loci in *Lycopersicon* (tomato) with the aid of genetic markers using approximate maximum likelihood methods. *Heredity* **59**: 413–421.
- Welter, L.J., Göktürk-Baydar, N., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R., Töpfer, R., and Zyprian, E.M.** (2007). Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Molecular Breeding* **20**: 359–374.
- Wiedemann-Merdinoglu, S., Prado, E., Coste, P., Dumas, V., Butterlin, G., and Merdinoglu, D.** (2006). Genetic analysis of resistance to downy mildew derived from *Muscadinia rotundifolia*. Ninth International Conference on Grape Genetics and Breeding. Udine. Italy, July 2-6.
- Wilcox, W., Agnello, A., Pearson, R., Dennehy, T., Pool, R., Reisch, B., Zabada, T., and Himelrick, D.** (1987). Grape pest control guide. Cooperative Extension Service. N.Y.
- Wilcox, W., Burr, J.A., Riegel, D., and Wong, F.** (2003). Practical resistance to QoI fungicides in New York populations of *Uncinula necator* associated with quantitative shifts in pathogen sensitivities. (Abstr.). *Phytopathology*: 93:S90.
- Wilocquet, L., Cartolaro, P., Jolivet, J., Richard-Cervera, S., and Delmotte, F.** (2007). Relationships between genetic group, symptom type, and epidemiological features in *Erysiphe necator*, the causal agent of grape powdery mildew. *Phytopathology* **97** (suppl.): S123.
- Winterhagen, P., Howard, S.F., Qiu, W., and Kovács, L.G.** (2008). Transcriptional Up-Regulation of Grapevine *MLO* Genes in Response to Powdery Mildew Infection. *American Journal of Enology and Viticulture* **2**: 159–168.
- Wong, F.P., Burr, H.N., and Wilcox, W.F.** (2001). Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* **50**: 427–432.
- Wu, F., Eannetta, N.T., Xu, Y., Bakaher, N., and Tanksley, S.D.** (2010). COSII genetic maps of two diploid *Nicotiana* species provide a detailed picture of synteny with tomato and insights into chromosome evolution in tetraploid *N. tabacum*. *Theoretical and Applied Genetics* **120**: 809–827.
- Xiao, S., Ellwood, S., Calis, O., Patrick, E., Li, T., Coleman, M., and Turner, J.G.** (2001). Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. *Science* **291**: 118–120.
- Xiao, S., Ellwood, S., Findlay, K., Oliver, R.P., and Turner, J.G.** (1997). Characterization of three loci controlling resistance of *Arabidopsis thaliana* accession Ms-0 to two powdery mildew diseases. *The Plant journal* **12**: 757–768.
- Xie, W., Ben-David, R., Zeng, B., Distelfeld, A., Röder, M.S., Dinooor, A., and Fahima, T.** (2012). Identification and characterization of a novel powdery mildew resistance gene *PmG3M* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. *Theoretical and Applied Genetics* **124**: 911–922.

- Yu, S., Zhang, F., Yu, R., Zou, Y., Qi, J., Zhao, X., Yu, Y., Zhang, D., and Li, L.** (2009). Genetic mapping and localization of a major QTL for seedling resistance to downy mildew in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Molecular Breeding* **23**: 573–590.
- Zeng, Z.** (1993). Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 10972–10976.
- Zhang, F., Luo, F., and Gu, D.** (1990). Studies on germplasm resources in wild grape species (*Vitis* spp.) in China. Proc. 5th Intern. Symp. Grape Breeding, St. Martin, 12-16 Sept. 1989. *Vitis*, Special Issue: 50–57.
- Zhang, N.W., Pelgrom, K., Niks, R.E., Visser, R.G.F., and Jeuken, M.J.W.** (2009). Three combined quantitative trait loci from nonhost *Lactuca saligna* are sufficient to provide complete resistance of lettuce against *Bremia lactucae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1160–1168.
- Zhang, S.** (2005). The inheritance and AFLP marker of downy mildew and powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). PhD dissertation, Northwest A & F University. (in Chinese).
- Zhou, F., Kurth, J., Wei, F., Elliott, C., Valè, G., Yahiaoui, N., Keller, B., Somerville, S., Wise, R., and Schulze-Lefert, P.** (2001). Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *Rar1*-independent signaling pathway. *The Plant Cell* **13**: 337–350.
- Zhou, W.-C., Kolb, F.L., Bai, G.-H., Domier, L.L., Boze, L.K., and Smith, N.J.** (2003). Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breeding* **122**: 40–46.
- Zhu, W., Ouyang, S., Iovene, M., Brien, K.O., Vuong, H., Jiang, J., and Buell, C.R.** (2008). Analysis of 90 Mb of the potato genome reveals conservation of gene structures and order with tomato but divergence in repetitive sequence composition. *BMC Genomics* **9**: 1–14.
- Zhu, Z., Zhou, R., Kong, X., Dong, Y., and Jia, J.** (2005). Microsatellite markers linked to 2 powdery mildew resistance genes introgressed from *Triticum carthlicum* accession PS5 into common wheat. *Genome National Research Council Canada* **48**: 585–590.
- Zohary, D. and Hopf, M.** (2000). *Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley* (Oxford University Press).
- Zou, W. and Zeng, Z.-B.** (2008). Statistical Methods for Mapping Multiple QTL. *International Journal of Plant Genomics* **2008**: 286561.
- Čuš, F., Česnik, H.B., Bolta, Š.V., and Gregorčič, A.** (2010). Pesticide residues in grapes and during vinification process. *Food Control* **21**: 1512–1518.





## RESUME

Les variétés traditionnelles de vigne nécessitent de très nombreux traitements phytosanitaires pour lutter contre les maladies cryptogamiques qui touchent leurs parties herbacées, comme le mildiou et l'oïdium, causés par *Plasmopara viticola* et *Erysiphe necator* respectivement. Ces traitements, coûteux et préjudiciables pour l'environnement, pourraient être réduits par l'emploi de variétés résistantes. La vigne cultivée européenne (*Vitis vinifera*, 2n=38) est très sensible au mildiou et à l'oïdium. En conséquence, la résistance doit être introduite à partir d'autres *Vitaceae* ayant un niveau de résistance plus élevé à ces maladies. Plusieurs origines de résistance ont déjà été observées et inventoriées, en particulier chez l'espèce d'origine américaine *Muscadinia rotundifolia* (2n=40). Ces facteurs sont d'un intérêt majeur pour la sélection de variétés résistantes. Cependant, lors du processus d'introgession, des difficultés à obtenir des pépins viables en F1 ainsi que des anomalies phénotypiques dans les descendance en rétrocroisement ont été constatées. Afin d'optimiser la gestion des résistances provenant de cette espèce dans les programmes d'amélioration variétale, il est nécessaire de comprendre l'organisation génétique et génomique de *M. rotundifolia*, et de compléter la connaissance des facteurs de résistance issus de cette espèce. Dans ce contexte, les objectifs de la thèse sont : (i) de réaliser une analyse comparative des génomes de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* et (ii) d'identifier de nouveaux facteurs de résistance chez *M. rotundifolia* utilisables à terme en sélection. Pour cela, une carte génétique de *M. rotundifolia* a été développée à partir d'une population de 200 individus issue de l'autofécondation de *M. rotundifolia* cv. Regale. Parallèlement, la même population a été testée pour son niveau de résistance au mildiou et à l'oïdium.

Une carte génétique couvrant 950 cM a été réalisée. Elle comprend 191 marqueurs microsatellites répartis sur les 20 chromosomes de *M. rotundifolia*, et permet de conclure à un niveau de macrosynténie très élevé avec *V. vinifera*. Le groupe de liaison 20 de *M. rotundifolia* correspondrait à la partie inférieure du groupe de liaison 7 de *V. vinifera*. Par ailleurs, un QTL de résistance au mildiou a été détecté sur le groupe de liaison 18 de *M. rotundifolia*, au niveau d'une région riche en gènes de type NBS-LRR, et un nouveau QTL de résistance majeur à la l'oïdium a été mis en évidence sur le groupe de liaison 14 de *M. rotundifolia*. Ce QTL, nommé *Ren5* pour '*Resistance to Erysiphe necator 5*', montre une action précoce dans l'arrêt de la croissance du mycélium du pathogène, dès l'établissement des premiers stades de biotrophie du champignon. De plus, le QTL *Ren5* a été confronté à deux souches supplémentaires d'*E. necator*, appartenant aux deux groupes d'oïdium retrouvés dans vignobles européens, contre lesquelles il reste efficace.

Les données de cartographie génétique générées pour *M. rotundifolia* dans ce travail, ainsi que la mise en évidence de *Ren5* et de son mode d'action, permettront d'améliorer la gestion des facteurs de résistance issus de cette espèce pour la sélection de variétés résistantes au mildiou et à l'oïdium.

Mots-clés : *Muscadinia rotundifolia*, *Vitis vinifera*, mildiou, oïdium, cartographie génétique, microsatellites, QTL, *Ren5*, amélioration variétale.

## ABSTRACT

Grapevine requires numerous harmful plant-health treatments, in particular to control downy and powdery mildews, caused by *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*, respectively. One way to reduce the use of fungicides in viticulture is to create resistant grapevine cultivars. European cultivated grapevine (*Vitis vinifera*, 2n=38) is susceptible to mildews, whereas related species such as *Muscadinia rotundifolia* (2n=40) exhibit high levels of resistance. In breeding programs, resistance factors from these related species are introduced into the susceptible elite varieties. Nevertheless, difficulties in obtaining viable seeds in the siblings of *Vitis* x *Muscadinia* crosses are observed. In order to optimize the management of resistance factors from *M. rotundifolia* in breeding programs, it is necessary to understand the genomic organisation of this species, and to complete the knowledge of these factors. Thus, the main objectives of this work are : (i) making a comparative analysis of *V. vinifera* and *M. rotundifolia* genomes and (ii) identifying new resistance factors from *M. rotundifolia*. For this purpose a framework genetic map of *M. rotundifolia* cv. Regale has been created, using a 200 individual S1 population. This population has also been screened for its resistance to downy and powdery mildew.

A 950 cM genetic map has been generated, including 191 SSR markers distributed across the 20 chromosomes of *M. rotundifolia*. A high level of macrosynteny has been observed between the *Muscadinia* map and the genetic maps available for *V. vinifera*. Linkage group (LG) 20 of *M. rotundifolia* matches with the lower part of *V. vinifera* LG7. Furthermore, a QTL for resistance to downy mildew has been identified on *M. rotundifolia* LG18, and a major QTL for resistance to powdery mildew has been mapped on LG14. The latest, called *Ren5* for '*Resistance to Erysiphe necator 5*', acts during an early stage to stop *E. necator*'s mycelium growth, since the first stages of biotrophy have been established for the fungus. Moreover, *Ren5* has been confronted to two additional powdery mildew strains, belonging to the two European groups of *E. necator*, and it remained efficient.

Gathering knowledge about the genetic organization of *M. rotundifolia*, and the mechanism and spectrum of action of newly identified resistance factors such as *Ren5*, will be useful to optimize the management of *M. rotundifolia* resistance traits in breeding programs aiming to create new resistant varieties to downy and powdery mildews.

Keywords : *Muscadinia rotundifolia*, *Vitis vinifera*, downy mildew, powdery mildew, genetic mapping, SSR, QTL, *Ren5*, breeding programs.