



HAL
open science

**Etude de la variabilité du pouvoir pathogène de
Plasmopara viticola à l'égard de la vigne. I. -
Comparaison de clones monosporocystes ; rôle de
l'hétérocaryose du parasite**

H. Li, J.P. Doazan, Michel Clerjeau

► **To cite this version:**

H. Li, J.P. Doazan, Michel Clerjeau. Etude de la variabilité du pouvoir pathogène de *Plasmopara viticola* à l'égard de la vigne. I. - Comparaison de clones monosporocystes ; rôle de l'hétérocaryose du parasite. *Agronomie*, 1986, 6 (2), pp.187-194. hal-02728242

HAL Id: hal-02728242

<https://hal.inrae.fr/hal-02728242>

Submitted on 2 Jun 2020

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.

Etude de la variabilité du pouvoir pathogène de *Plasmopara viticola* à l'égard de la vigne. I. — Comparaison de clones monosporocystes ; rôle de l'hétérocaryose du parasite

Hua LI, Jean-Pierre DOAZAN & Michel CLERJEAU (*)

I.N.R.A., Station de Recherches de Viticulture

(*) I.N.R.A., Station de Pathologie végétale, Centre de Recherches de Bordeaux, B.P. 131, F 33140 Pont de la Maye

RÉSUMÉ

Une étude de base sur la variabilité naturelle du pouvoir pathogène de *Plasmopara viticola* a été engagée afin d'estimer les risques éventuels de faillite des gènes de résistance de la vigne. Cette variabilité se manifeste tout d'abord par une grande hétérogénéité de dimension du sporocyste et du nombre de ses noyaux, donc de zoospores. Cependant, ce sont les différences génétiques entre noyaux qui revêtent le plus d'importance : on a pu, grâce à des repiquages monosporocystes successifs obtenir des clones dont le taux de sporulation présente une variabilité réduite par rapport à celle de la population initiale. On a montré notamment qu'un sporocyste, prélevé au hasard dans une population naturelle, peut donner naissance à plusieurs clones, très probablement homocaryotiques, présentant des niveaux d'agressivité variés. Le pouvoir pathogène d'un mélange de clones différents utilisé en infection artificielle est supérieur à celui des clones utilisés séparément. Cette synergie peut s'expliquer par une complémentarité de codage génétique entre noyaux différents. Par ailleurs, on doit supposer l'existence d'échanges nucléaires entre thalles, grâce à la formation d'anastomoses, pour interpréter la composition des sporocystes issus de la contamination par un mélange de clones résistants et sensibles au métalaxyl. Ces échanges nucléaires entre thalles dont les noyaux portent des informations génétiques complémentaires doivent maintenir l'agressivité du parasite à son niveau maximum. Les conséquences de cette situation sur la sélection que peuvent opérer les variétés peu sensibles parmi les populations nucléaires de *Plasmopara viticola* sont à évaluer.

Mots clés additionnels : *Vitis vinifera*, mildiou, résistance variétale, métalaxyl, résistance aux fongicides.

SUMMARY

Variability of pathogenicity in Plasmopara viticola. I. — Comparative aggressiveness of different monosporocystic clones ; influence of pathogen heterokaryosis.

A basic study on the natural variability of pathogenicity in *Plasmopara viticola* was undertaken in order to estimate the risks that the resistance genes of grapevine may fail. Firstly, great heterogeneity was found both in sporocyst size and in number of nuclei per sporocyst and thus in zoospore number. However, the most important differences were genetic ones between different nuclei : by means of successive single sporocyst multiplications, clones were obtained whose sporulation rate was greatly reduced in comparison with that of the initial population. In particular, one sporocyst randomly taken in a natural population gave rise in this way to several clones, each very probably homokaryotic but differing from others in level of aggressiveness. Mixed inoculation with different clones gave pathogenicity higher than that of each clone considered separately. This synergism could be due to complementary action of various types of nuclei. Moreover, the results of inoculation with a mixture of two clones, one resistant and the other susceptible to metalaxyl, suggested that nuclear exchanges had taken place by anastomosis between thalli of the two origins. Such nuclear exchanges between thalli whose nuclei carry complementary genetic information may keep the aggressiveness of the parasite at a high level. The incidence of these findings on the selection that less susceptible varieties may exert on the population of nuclei of *Plasmopara viticola* remains to be considered.

Additional key words : *Vitis vinifera*, downy mildew, varietal resistance, metalaxyl, fungicide resistance.

I. INTRODUCTION

La résistance variétale est largement utilisée depuis un siècle, en viticulture, pour lutter contre le mildiou dû à *Plasmopara viticola* (B. & C.) Berl. & de Toni. La base génétique de résistance, présente chez de nombreuses espèces du genre *Vitis* (à l'exception de *V. vinifera* L.) et constituée de plusieurs gènes d'action partielle (BOUBALS, 1959), a largement servi dans le passé pour créer des hybrides interspécifiques porte-greffes et greffons. De tels hybrides sont repris aujourd'hui comme géniteurs dans de nombreux programmes d'amélioration de la résistance des variétés, comme celui qui est conduit dans notre laboratoire (DOAZAN, 1980). L'absence d'attaques notables observées jusqu'à présent sur les vignes résistantes cultivées dans de nombreux pays a fondé progressivement la conviction que les systèmes géniques utilisés étaient incontournables par le parasite. On doit cependant observer, chez *P. viticola*, une capacité de variation du pouvoir pathogène. Celle-ci a pu être démontrée expérimentalement par BOUBALS (1959) en comparant la virulence de plusieurs populations (dont certaines provenant de pépinières d'hybrides interspécifiques anormalement attaqués) à l'égard d'une gamme d'hôtes différentiels. La mise en évidence dans la nature de souches de *P. viticola* résistantes aux fongicides de la famille des anilides est venue d'autre part confirmer récemment la potentialité de variation du champignon (CLERJEAU & SIMONE, 1982).

Compte tenu des objectifs actuels de la sélection qui sont de créer des variétés résistantes de haute qualité agronomique et organoleptique, on peut craindre que les rétrocroisements nombreux avec les géniteurs sensibles de *V. vinifera* n'entraînent une érosion de la résistance par perte de gènes mineurs. On peut se demander, dans cette hypothèse, si les futures variétés résistantes ne présenteront pas une plus grande vulnérabilité à l'adaptation du parasite. Ceci nous a conduits à engager une étude de base sur la variabilité naturelle du pouvoir pathogène de *P. viticola* afin de déterminer les risques éventuels de faillite des gènes de résistance utilisés. Le travail présenté ici, qui est une première étape de l'étude, a pour objet de montrer les différences d'agressivité entre sporocystes isolés d'un même ou de plusieurs isolats d'origines variées et de préciser le rôle de la composition nucléaire du thalle dans l'expression de ces différences.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Matériel végétal

L'ensemble des essais présentés a été réalisé au laboratoire sur des disques de feuilles de *V. vinifera* cv. « Muscadelle » prélevés sur des jeunes plants bouturés, âgés de 2 mois environ, élevés en serre. Les disques, de 12 mm de diamètre, découpés à l'emporte-pièce, étaient maintenus en survie dans des boîtes de Petri au contact de 3 couches de papier filtre imbibées d'eau. La protection contre la moisissure due à *Botrytis cinerea* a été assurée par une pulvérisation de procymidone (1,2 g/l) et de benomyl (0,9 g/l).

B. Matériel cryptogamique

Huit populations de *P. viticola* issues de diverses régions viticoles françaises ont été utilisées : Cognac, Bordeaux, Anjou, Champagne, Côtes du Rhône, Alsace et Languedoc. Elles ont été conservées, après leur prélèvement, par congélation des sporocystes à la température de -18°C , dans une suspension aqueuse de glycérol (8 ml/100 ml) et de lait écrémé en poudre (8,5 g/100 ml). Au cours de leur étude, elles ont été repiquées toutes les semaines sur des disques de feuille de vigne en survie, en boîtes de Petri, en chambre climatique à la température de 20°C .

Compte tenu de l'absence de repiquages successifs préalables à leur étude, on peut considérer que les souches n'ont pas évolué au laboratoire entre leur isolement dans la nature et l'analyse de leur variabilité.

C. Technique d'infection artificielle

Le pouvoir pathogène des souches a été évalué à partir de sporocystes recueillis à l'aide d'un pinceau après 6 j d'incubation, puis mis en suspension dans de l'eau permutée. Les suspensions de sporocystes ont été déposées sur la face inférieure des disques de feuilles à contaminer à l'aide d'une micropipette (type Eppendorf) à raison d'une gouttelette de 25 μl par disque ; les gouttelettes étaient éliminées par aspiration sous vide, 24 h après.

D. Techniques de biométrie et de cytologie

Pour apprécier le nombre et les dimensions des noyaux contenus dans les sporocystes, une coloration spécifique par le carmin acétique ferrique a été réalisée (BELLING, 1926), suivie d'une observation microscopique au grossissement 1000.

La longueur et la largeur des sporocystes ont été mesurées sur l'écran d'un monitor reproduisant l'image obtenue grâce à un microscope Olympus BH-2 (Grossissement 1000) et à une caméra vidéo Panasonic WV 3600 E, à partir d'un échantillonnage de sporocystes collectés sur des taches fructifères de disques de feuilles, après 6 j d'incubation.

E. Obtention de clones monosporocystes

Le prélèvement puis la contamination à l'aide de sporocystes individualisés à partir d'une population ont fait appel à la méthodologie suivante : les suspensions de sporocystes, diluées à la concentration de 1 000 sporocystes par ml, sont étalées sur des lames porte-objet enduites d'une mince couche d'eau gélosée (agar-agar 15 g/l). Dans ces conditions, il est aisé d'individualiser un sporocyste par champ de microscope au grossissement 200. Les sporocystes isolés ainsi repérés sont prélevés sous le microscope à l'aide d'une pipette Pasteur et immédiatement transférés dans une gouttelette d'eau de 25 μl placée sur la face inférieure d'un disque de feuille.

Dans le cas de la réalisation de plusieurs repiquages monosporocystes successifs (clonage), 20 sporocystes sont isolés puis déposés séparément sur 20 disques de

feuilles, à partir d'une seule tache fructifère de l'un des 20 disques utilisés à la génération précédente. Afin d'accélérer les opérations d'isolement des sporocystes, les repiquages ont été effectués dès le début de la sporulation.

F. Appréciation de la variabilité du pouvoir pathogène des clones ou des populations

Le critère retenu pour mesurer le pouvoir pathogène des souches est le taux de sporulation. Celui-ci est apprécié sur 30 disques, issus de 3 feuilles différentes, contaminés par une gouttelette de 25 µl de suspension aqueuse contenant 5 sporocystes (soit 200 sporocystes par ml). Après 6 j d'incubation à 22 °C, dans des conditions de lumière alternée (12 h d'éclairage par tubes fluorescents ; 12 h d'obscurité), chaque disque est affecté d'une note comprise entre 0 et 10, fonction de l'intensité de la sporulation et de la surface de la tache fructifère, inspirée de DESAYMARD (1968). Ce système retenu pour apprécier l'efficacité des fongicides anti-mildiou au vignoble, offre l'avantage de permettre une analyse de variance des notes.

G. Appréciation de la résistance des sporocystes au métalaxyl

Le caractère de résistance au métalaxyl a été utilisé comme marqueur génétique susceptible de mettre en évidence des échanges nucléaires entre souches de *P. viticola* à l'intérieur des tissus parasités. La méthode utilisée pour distinguer les souches sensibles et résistantes, a déjà été décrite (CLERJEAU & SIMONE, 1982). Son principe consiste à déposer les suspensions de sporocystes sur des disques de feuilles placés en boîtes de Petri sur une solution de métalaxyl. Aux concentrations supérieures à 5 p.p.m., seules les souches résistantes peuvent sporuler.

III. RÉSULTATS

Dans le travail présenté, l'intensité de la sporulation a été retenue comme critère de mesure du pouvoir pathogène. Afin d'étudier la variabilité de ce caractère au sein des populations de *P. viticola*, il aurait convenu de comparer les aptitudes de souches monozoospores. Les zoospores étant généralement uninucléées, de telles souches peuvent en effet être considérées comme très probablement homocaryotiques. Toutefois, en raison des nombreux échecs essayés dans les tentatives d'infection à l'aide de zoospores isolées, il a été nécessaire d'effectuer l'étude à partir de souches monosporocystes. Bien que chez les champignons siphomycètes, comme *P. viticola*, les noyaux conidiens puissent être considérés théoriquement comme issus de la division d'un noyau unique, il est essentiel de comparer les aptitudes pathogènes conférées individuellement par ces divers noyaux et d'évaluer les possibilités d'échanges nucléaires entre thalles d'origine différente. Pour cela, plusieurs repiquages monosporocystes successifs ont été réalisés afin d'obtenir *in*

fine, à partir d'une conidie donnée, plusieurs clones ayant une forte probabilité d'être homocaryotiques. Avant d'entreprendre ce travail, une meilleure connaissance de la variabilité morphologique des sporocystes est apparue nécessaire.

A. Etude de la variabilité morphologique des sporocystes de *P. viticola*

Des mesures de longueur et de largeur ont été effectuées sur un effectif de 1 000 sporocystes prélevés au hasard sur des disques contaminés depuis 6 j : cet échantillon était constitué d'un mélange en proportions identiques de 8 populations distinctes provenant de diverses régions viticoles françaises.

Les résultats rapportés dans le tableau 1 montrent la grande hétérogénéité des dimensions des sporocystes. Leur longueur peut en effet s'établir entre la classe 5,1-10 µ et la classe 30,1-35 µ, leur largeur se situant entre les classes 5,1-10 µ et 20,1-25 µ. Cette disparité des mensurations qui avait été signalée sans être quantifiée par ARNAUD & ARNAUD (1931) ($L : 17$ à 25μ ; $l : 10$ à 16μ) et NICOLAEV (1972) ($13,5 \mu < L < 37,8 \mu$) apparaît plus importante que celle indiquée par ces auteurs.

Le dénombrement des noyaux contenus dans les sporocystes a permis d'établir, comme NICOLAEV (1972), l'existence d'une relation linéaire entre la longueur des sporocystes et le nombre des noyaux, lequel est compris entre 1 et 10 (fig. 1). On a noté, par ailleurs, que les noyaux, de forme généralement sphérique, ont un diamètre qui peut varier entre 2 et 4 µ.

B. Etude du pouvoir pathogène de sporocystes isolés

1. Sporocystes individualisés à partir de populations naturelles

Vingt sporocystes ont été isolés respectivement, à partir de 8 populations naturelles de *P. viticola*, puis déposés individuellement sur disques de feuilles. Les taux de sporulation notés sur les 160 disques (tabl. 2) montrent que la majorité des sporocystes ne permet pas d'obtenir d'infection. En effet, avec 7 populations sur 8, la fréquence moyenne d'infection n'est pas supérieure à 20 p. 100. Bien qu'avec la population Cognac 1 cette fréquence ait atteint 70 p. 100, il n'est

TABLEAU 1

Distribution de fréquences (en pourcentages) des sporocystes en fonction de leurs dimensions (longueur et largeur) établie à partir de 1 000 sporocystes issus d'un mélange de populations.

Frequency distribution (% of sporocysts by their size (length and width) based on the observation of 1 000 sporocysts from a mixture of populations.

	Limites de classes (µ)						Moyenne (µ)
	5,1-10	10,1-15	15,1-20	20,1-25	25,1-30	30,1-35	
Longueur	12	46	28	11	2	1	14,9
Largeur	42	46	8	4			11,2

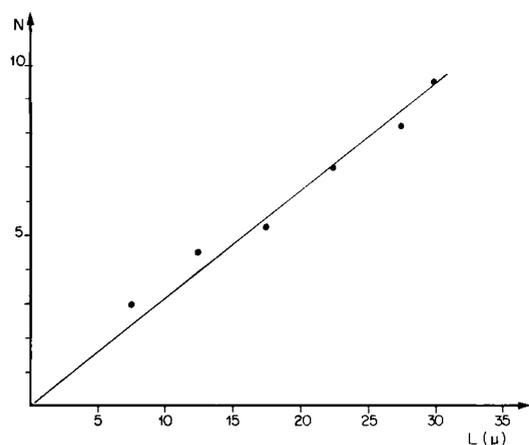


Figure 1

Relation entre le nombre de noyaux (N) par sporocyste et la longueur des sporocystes (L).

Relationship between number of nuclei per sporocyst (N) and sporocyst length (L).

pas possible de conclure à des potentialités particulières de cette souche.

On observe, en outre, que l'abondance de la sporulation induite par chaque sporocyste varie dans de fortes proportions : elle est généralement faible (notes 1

à 3) mais peut, dans certaines populations, être forte (note 5 avec l'isolat Cognac 1) ou très forte (note 9 avec l'isolat Cognac 2). On peut supposer que la dimension des sporocystes, qui dépend du nombre de noyaux et donc conditionne le nombre de particules infectieuses (zoospores) est en relation avec leurs aptitudes pathogènes, bien que cela n'ait pas été démontré.

2. Sporocystes isolés après plusieurs clonages successifs

Neuf repiquages monosporocystes successifs de la population Cognac 2 ont été effectués, en isolant et en inoculant 20 sporocystes à chaque cycle. Les populations ainsi obtenues sur les disques contaminés ont permis d'apprécier, cycle après cycle, l'évolution des aptitudes pathogènes des sporocystes due à la sélection progressive de noyaux identiques. L'examen des données du tableau 3 révèle que, à partir du 7^e clonage, les sporocystes isolés des taches fructifères possèdent des propriétés comparables et stables dans le temps (note de sporulation 7 sur 10 pour l'ensemble des sporocystes de l'effectif). Ce résultat implique que les noyaux constitutifs des sporocystes d'une population sont très probablement différents et confèrent des aptitudes sporulantes spécifiques aux souches qui en

TABLEAU 2

Nombres de disques de feuilles, contaminés par des sporocystes individualisés provenant de plusieurs populations de *Plasmopara viticola*, répartis en fonction de leur note de sporulation (0-10).

Numbers of leaf discs, inoculated with single sporocysts isolated from several *Plasmopara viticola* populations, distributed by their sporulation rating (0-10).

Origine géographique des populations	Notes de sporulation après 6 j d'incubation										Fréquence moyenne d'infection en p. 100 ⁽¹⁾	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10
Cognac 1	6	7	2	3	1	1						70
Cognac 2	17	1	1							1		15
Bordeaux	16	3	1									20
Anjou	16	2	2									20
Champagne	17	1	1	1								15
Côtes-du-Rhône	18	1		1								10
Alsace	17	1	1	1								15
Languedoc	16	3		1								20

⁽¹⁾ Calculée selon la formule $\frac{\text{Nombre de disques sporulés}}{\text{Nombre total de disques}} \times 100$

TABLEAU 3

Nombres de disques de feuilles, contaminés par des sporocystes provenant d'une population de *Plasmopara viticola* (Cognac 2), répartis en fonction de leurs notes de sporulation : évolution au cours de plusieurs repiquages monosporocystes (20 sporocystes isolés par repiquage).

Numbers of leaf discs, inoculated with sporocysts isolated from one *Plasmopara viticola* population (Cognac 2), distributed by their sporulation rating : change over several monosporocystic subcultures (20 single sporocysts for each subculture).

Nombre de repiquages monosporocystes	Notes de sporulation après 6 j d'incubation										Fréquence moyenne d'infection en p. 100	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10
1	17	1	1								1	15
3	11		2	3	2	1				1		45
7	3								17			85
8	3								17			85
9	3								17			85

sont issues. Grâce au clonage monosporocyste répété sur plusieurs cycles, il est possible d'obtenir des sporocystes ayant une constitution nucléaire homogène qui peuvent, en se multipliant, conserver la même structure et les mêmes propriétés.

En raison de l'intérêt pratique, pour la réalisation d'infections artificielles, que pourraient représenter des souches pures génétiquement homogènes, il est important d'étudier la variabilité du pouvoir pathogène des souches de *P. viticola* obtenues au fur et à mesure des repiquages monosporocystes successifs.

C. Variabilité du pouvoir pathogène de souches issues de plusieurs clonages monosporocystes successifs

La variabilité de plusieurs souches monosporocystes issues de la population Cognac 1 a été appréciée respectivement après 3 et 7 clonages monosporocystes par la contamination de 30 disques avec des suspensions apportant 5 sporocystes par disque de feuille.

— A l'issue du 3^e clonage, 2 souches ont été utilisées : une souche A correspondant à la tache fructifère d'un disque noté 8 sur 10 et une souche B correspondant à la fructification d'un disque noté 2 sur 10. Les résultats de contamination de ces 2 souches, résumés par la figure 2, montrent une sporulation plus abondante de la souche A, la différence étant hautement significative (F calculé = 66,161 pour F 0,005 = 8,89, avec 54 degrés de liberté pour l'erreur). De plus, l'étendue de la variation est importante pour chacune des 2 souches (notes comprises entre 1 et 9 pour A et entre 0 et 6 pour B). Ces données indiquent que, après 3 clonages monosporocystes, les populations de spores, bien qu'encore hétérogènes sur le plan nucléaire, contiennent un échantillonnage de noyaux moins diversifié que celui du sporocyste tête de clone.

— A l'issue du 7^e clonage, toutes les taches fructifères obtenues présentent un aspect comparable (note moyenne 7 sur 10). Deux souches C et D, prélevées à partir de 2 disques différents, puis servant chacune à contaminer 30 disques, ont permis d'obtenir des sporulations rigoureusement comparables dont l'étendue de la distribution est extrêmement réduite (fig. 3). A ce stade, on peut considérer que les souches de *P. viticola* correspondent à des clones homocaryotiques. Ceci leur confère des aptitudes pathogènes constantes et reproductibles. Compte tenu de ce phénomène, nous avons pu, en sélectionnant des disques peu ou très sporulés, lors des diverses étapes du clonage, obtenir des souches peu ou très sporulantes.

Etant donné qu'au moins 6 à 7 repiquages monosporocystes sont nécessaires pour stabiliser les propriétés sporulantes des souches, il paraît évident que les noyaux conidiens ne sont pas tous issus de la division du noyau contenu dans la zoospore d'origine. C'est pourquoi nous avons tenté de vérifier l'hypothèse d'un échange de noyaux entre thalles d'origines différentes.

D. Mise en évidence d'échanges nucléaires entre souches

A partir d'un clone sensible au métalaxyl (S) et d'un clone résistant (R), issus respectivement de 6 repiquages monosporocystes, une population mixte a été constituée en mélangeant des sporocystes R et S en égale proportion. La population mixte R-S, a été repiquée durant 5 cycles successifs sur disques de feuilles, à l'issue desquels le caractère de résistance au métalaxyl a été recherché chez 40 sporocystes isolés. Pour cela, chaque population issue d'un repiquage de ces sporocystes a été testée sur 10 disques de feuilles traités par le métalaxyl (C = 5 p.p.m.) et sur 10 disques témoins. Les sporulations moyennes obtenues et

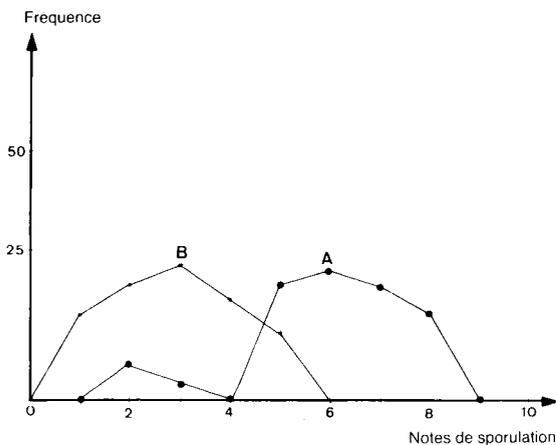


Figure 2
Comparaison des taux de sporulation de 2 souches de *P. viticola*, issues d'une même population (Cognac 1), après 3 repiquages monosporocystes : distribution des notes entre 0 et 10.
A = souche issue d'une tache très sporulée : 8 sur 10,
B = souche issue d'une tache peu sporulée : 2 sur 10.

Comparative sporulation rates of two *P. viticola* isolates obtained from the same population (Cognac 1), after 3 monosporocyst subcultures : distribution of scores from 0 to 10.

A = isolate from a highly sporulating lesion : 8/10,
B = isolate from a poorly sporulating lesion : 2/10.

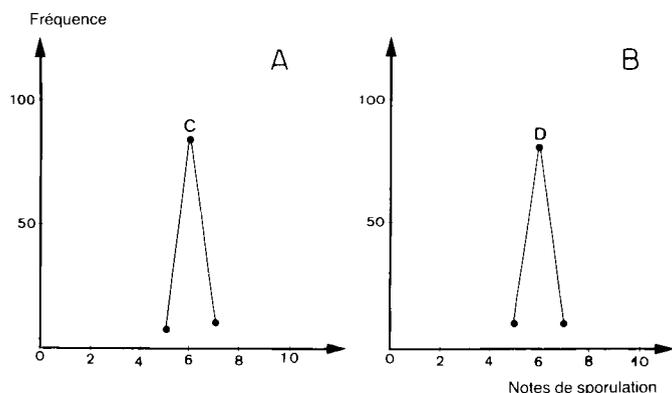


Figure 3
Comparaison des taux de sporulation de 2 souches de *P. viticola*, issues d'une même population (Cognac 1), après 7 repiquages monosporocystes : distribution des notes entre 0 et 10.
C et D = souches issues de 2 taches sporulées différentes affectées de la même note : 7 sur 10.

Comparative sporulation rates of two *P. viticola* isolates obtained from the same population (Cognac 1), after 7 monosporocyst subcultures : distribution of scores from 0 to 10.

C and D = isolates from two sporulating spots having the same rating 7/10.

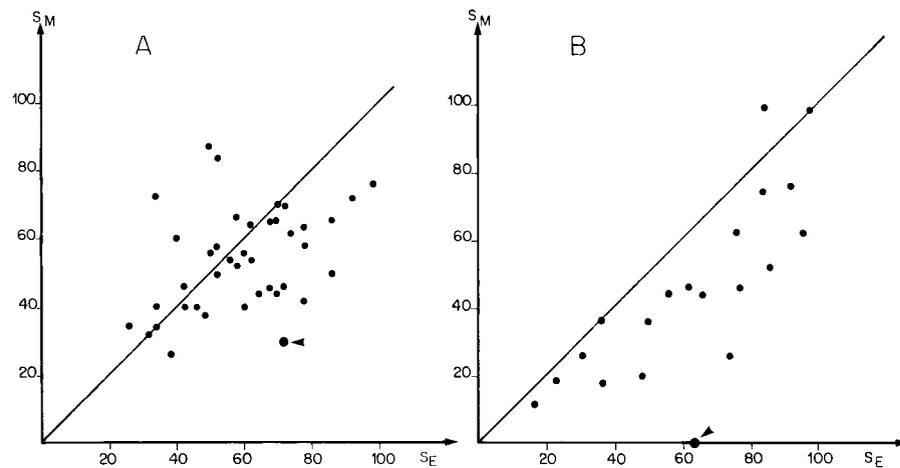


Figure 4

Obtention de sporocystes hétérocaryotiques R-S sur des disques de feuilles contaminés par un mélange de souches homocaryotiques S (sensibles au métalaxyl) et de souches homocaryotiques R (résistantes au métalaxyl).

4A — Appréciation de la résistance au métalaxyl de 40 sporocystes individualisés à partir d'une population résultant de l'infection par des souches R et des souches S en mélange ($\frac{R}{S} = 1$).
(Flèche = sporocyste Sp.)

4B — Appréciation de la résistance au métalaxyl de 20 sporocystes individualisés à partir de la population produite par le sporocyste Sp. (fig. 4A).
(Flèche = souche sensible)

S_m = Notes sporulation disques métalaxyl (en p. cent).

S_c = Notes sporulation disques non-traités (en p. cent).

Production of heterokaryotic R-S sporocysts on leaf discs inoculated with a mixture of homokaryotic S isolates (susceptible to metalaxyl) and homokaryotic R isolates (resistant to metalaxyl).

Estimated resistance to metalaxyl of 40 sporocysts isolated from a population originating from inoculation with a mixture of R and S isolates ($\frac{R}{S} = 1$).
(Arrow = Sp. sporocyst)

Estimated resistance to metalaxyl of 20 sporocysts isolated from the population obtained from the Sp. sporocyst (fig. 4A).
(Arrow = susceptible isolate)

portées sur la figure 4A indiquent que toutes les populations sont résistantes. Après avoir choisi parmi ces populations celle dont la sporulation relative en présence de métalaxyl a été la plus faible (marquée d'une flèche sur la figure 4A), puis après avoir isolé 20 sporocystes de cette sporulation, la résistance au métalaxyl a été recherchée chez les souches provenant du repiquage de ces sporocystes. La figure 4B montre que l'une de ces souches (marquée d'une flèche) capable de fructifier en absence de métalaxyl mais non en présence du fongicide, est sensible au métalaxyl. Ces résultats montrent que les 2 clones initiaux S et R ont pu échanger leur matériel nucléaire en constituant une population mixte à partir de laquelle les déterminants nucléaires R et S ont été individualisés par repiquage: monosporocystes.

E. Influence de l'hétérocaryose sur l'expression du pouvoir pathogène.

L'ensemble des résultats présentés indiquant que le mycélium de *P. viticola* (qui donne naissance aux sporocystophores et aux sporocystes) est constitué d'une population de noyaux différents qui, individuellement, confèrent des propriétés pathogènes homogènes et stables, il est intéressant d'étudier l'incidence de l'hétérocaryose sur l'expression du pouvoir pathogène. Pour cela, nous avons comparé le taux de sporulation induit par 4 clones homocaryotiques A1, A2, B1, C1, au taux de sporulation induit par les mélanges de clones : (A1 + A2) et (B1 + C1). En considérant les notes consignées dans le tableau 4, on remarque

que le résultat de l'infection par un mélange de 2 clones ayant une aptitude sporulante distincte est supérieur à celui qui est obtenu par l'un ou l'autre de ces clones séparément. L'écart obtenu est de même amplitude qu'il s'agisse de clones issus d'une même population initiale A ou qu'il s'agisse de clones issus de populations distinctes B et C. Le phénomène de synergie parasitaire induit par l'association des clones paraît lié aux noyaux dans la mesure où il est observé dans le cas du mélange des clones A1 et A2 qui possèdent le même cytoplasme.

IV. DISCUSSION — CONCLUSION

A la différence d'autres genres de siphomycètes (*Phytophthora*, *Bremia*, *Peronospora* par exemple), la génétique ou les sources de variations de *P. viticola* ont été peu étudiées jusqu'à présent (SHAW, 1983a, b). On sait cependant que la reproduction sexuée qui intervient chaque année, assurant la conservation du champignon grâce aux oospores, doit être à l'origine de recombinaisons qui peuvent conduire à de nouveaux biotypes. D'autres phénomènes peuvent aussi intervenir. C'est le cas des mutations auquel on peut vraisemblablement attribuer l'acquisition de résistance au métalaxyl, comme chez *Phytophthora* sp. (DAVIDSE, 1982). L'état haploïde du champignon lors des cycles de multiplication asexuée (BOSC, 1946) doit faciliter l'expression de ces mutations indépendamment de la dominance des caractères concernés. L'hétérocaryose,

TABLEAU 4

Taux de sporulation comparés de clones issus de populations différentes ou d'une même population, inoculés individuellement ou en association sur des disques de feuilles.
Comparative sporulation rates of clones either derived from different populations or from the same population and inoculated singly or mixed on leaf discs.

Populations	Clones inoculés	Concentration d'inoculum (nombre de sporocystes/ml)	Taux moyen de sporulation (¹)			P.P.D.S. 0,001
A	A1	200	4,93			0,773
	A2	200	3,03	**	**	
	A1 + A2	100 + 100	6,50	**	**	
B	B1	200	6,03	**		
C	C1	200	3,40		**	0,340
	B1 + C1	100 + 100	7,75	**		

(¹) 30 disques contaminés par les clones A1, A2 et (A1 + A2).

60 disques contaminés par les clones B1, C1 et (B1 + C1).

** Différences hautement significatives (seuil de probabilité 1 p. 1 000).

mise en évidence par NIKOLAEV (1972) en analysant les caractères biométriques des sporocystes issus de souches monosporocystes et monozoosporocystes constitue une autre cause de variation du champignon. L'hétérocaryose doit, en outre, favoriser l'obtention de nouveaux individus par recombinaison mitotique entre noyaux végétatifs différents.

Les diverses possibilités théoriques de variation du pouvoir pathogène offertes par la génétique de *P. viticola* et énoncées précédemment peuvent probablement expliquer les différences d'aptitudes sporulantes entre souches ou entre sporocystes, mises en évidence expérimentalement (tabl. 2). Si, pour expliquer cette variabilité, on doit tenir compte des différences de dimensions entre sporocystes (tabl. 1) auxquelles est lié le nombre de noyaux donc de zoospores (fig. 1), il convient de souligner les différences génétiques entre noyaux. Il a, en effet, été possible, grâce à des repiquages monosporocystes successifs, conduisant à l'obtention de clones distincts, de réduire la variabilité du taux de sporulation des souches de *P. viticola*. On a montré notamment qu'un sporocyste, prélevé au hasard dans une population naturelle, peut donner naissance à plusieurs clones présentant des niveaux d'agressivité très différents. Ces clones, très probablement homocaryotiques, constituent des souches dont le pouvoir pathogène, à la différence de la souche origine, est stable et extrêmement peu variable (tabl. 3 ; fig. 3). Tout se passe donc comme si chacun des noyaux contenus dans un sporocyste portait une information génétique correspondant à un niveau de pouvoir pathogène optimal bien défini. Il est remarquable que le pouvoir pathogène d'un mélange de clones homocaryotiques différents se montre supérieur à celui de chacun des clones (tabl. 4). Cette synergie, mise en évidence en utilisant de faibles concentrations de spores, peut s'expliquer par une complémentarité de codage génétique entre noyaux différents.

Le fait que les sporocystes de *P. viticola* soient hétérocaryotiques montre que les noyaux qu'ils contiennent ne sont pas issus de la multiplication d'un noyau unique initial qui, comme l'indiquent ISTVANFFI & PALINKAS (1913), subit plusieurs divisions après être passé du stérigmate au sporocyste en formation. On doit en revanche supposer l'existence d'échanges nucléaires entre thalles issus de la germination des zoospores comme l'indique la composition des sporocystes issus de la contamination d'un mélange de clones résistants et sensibles au métalaxyl (fig. 4). L'existence d'anastomoses entre thalles de *P. viticola* n'a jamais été signalée. En revanche, NIKOLAEV (1972) évoque une possibilité de fusion entre zoospores avant la pénétration. Le fait qu'au moins 6 repiquages monosporocystes soient généralement nécessaires à l'obtention de clones aux propriétés non variables (tabl. 3 ; fig. 2, fig. 3) suggère que ces phénomènes de couplage sont fréquents.

En conclusion, *P. viticola* apparaît comme un champignon à génome composite figuré par une population de noyaux dispersés dans le thalle, codant pour des propriétés pathogènes spécifiques. Grâce à cette hétérogénéité nucléaire, entretenue par la fusion des zoospores ou des thalles et grâce à la complémentarité des informations génétiques supportées par ces noyaux, l'agressivité du parasite peut être maintenue à son niveau maximum. Compte tenu de cette situation, il paraît important d'évaluer les risques de sélection que peuvent opérer les variétés peu sensibles parmi les populations nucléaires de *P. viticola*. Par ailleurs, il convient d'étudier l'intérêt que peuvent présenter les clones homocaryotiques pour la réalisation des tests d'infection artificielle, en sélection. Ces voies de recherches sont actuellement poursuivies.

Reçu le 13 mai 1985.

Accepté le 14 octobre 1985.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arnaud G., Arnaud M.**, 1931. *Traité de Pathologie Végétale* t. 1. Collection Encyclopédie mycologique III. Lechevalier Ed., Paris, 993 p.
- Belling J.**, 1926. The iron-acetocarmin method of fixing and staining chromosomes. *Biol. Bull.*, 50, 160-162.
- Bosc M.**, 1946. Sur la structure des noyaux et de la méiose de *Plasmopara viticola* (Berl. et de Toni). *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 223, 584-596.
- Boubals D.**, 1959. *Contribution à l'étude des causes de la résistance au mildiou de la vigne (Plasmopara viticola) et de leur mode de transmission*. Thèse Doct. Sci. Nat., Univ. Montpellier. *Ann. Amélior. Plantes*, 9, 5-233.
- Clerjeau M., Simone J.**, 1982. Apparition en France de souches de mildiou (*Plasmopara viticola*) résistantes aux fongicides de la famille des anilides (métalaxyl, milfurame). *Prog. Agric. Vitic.*, 99 (3), 59-61.
- Davidse L. C.**, 1982. Acylalanines : resistance in downy mildews, *Pythium* and *Phytophthora* spp., 118-127. In : J. Dekker & S. G. Georgopoulos : « *Fungicide resistance in crop protection* ». Wageningen, The Netherlands, 265 p.
- Desaynard P.**, 1968. Notations et méthodes de notation en phyto-pharmacie. *Phytiatr. Phytopharm.*, 2, 163-173.
- Doazan J. P.**, 1980. The selection of grapevine genotypes resistant to fungus diseases and their use under field conditions. *Proc. 3rd Int. Symp. Grape Breeding*, Univ. of California Ed., Davis, 324-331.
- Istvanffi (de) Gy, Palinkas Gy**, 1913. Etudes sur le mildiou de la vigne. *Rev. Vitic.*, XL (1036), 482-484, 509-513, 540-543.
- Nicolaev A. V.**, 1972. *Etude de la variation morphologique et biologique à l'intérieur de l'espèce Plasmopara viticola, agent du mildiou de la vigne*. Thèse, Inst. Agric. Frunze Ed., Kishinev, U.R.S.S.
- Shaw D. S.**, 1983a. The Peronosporales : a fungal geneticist's nightmare, 85-121. In : S. T. Buczacki : « *Zoosporic plant pathogens : a modern perspective* ». Acad. Press, London, 352 p.
- Shaw D. S.**, 1983b. The cytogenetics and genetics of *Phytophthora*, 81-94. In : D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P. H. Tsau : « *Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology and pathology* ». Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, 392 p.