



HAL
open science

Des vignes, des invasions et des résistances

François Delmotte, Frédéric Fabre, Anne-Sophie Miclot, Manon Paineau,
Christophe Schneider, Laurent Deliere

► **To cite this version:**

François Delmotte, Frédéric Fabre, Anne-Sophie Miclot, Manon Paineau, Christophe Schneider, et al..
Des vignes, des invasions et des résistances. L'immunité des plantes. Pour des cultures résistantes aux
maladies, 2021, Livre papier : 9782759232338 ; EAN13 eBook [PDF] : 9782759232345 ; EAN13 eBook
[ePub] : 9782759232352. hal-03206064

HAL Id: hal-03206064

<https://hal.inrae.fr/hal-03206064>

Submitted on 22 Apr 2021

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.

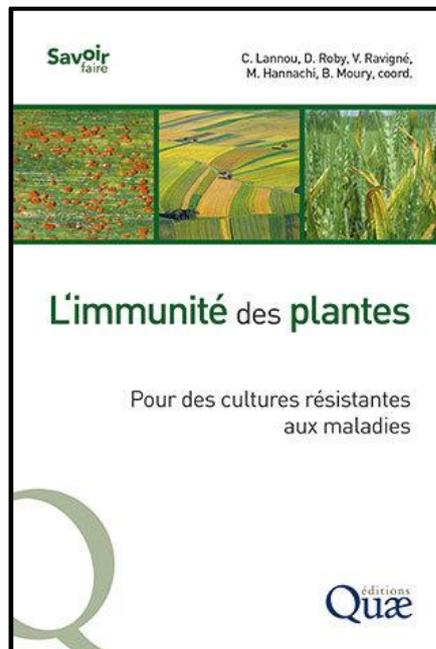
Des vignes, des invasions et des résistances

*François Delmotte¹, Frédéric Fabre¹, Anne-Sophie Miclot¹, Manon Paineau¹,
Christophe Schneider², Laurent Delière^{1,3}*

¹INRAE, UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, Bordeaux

²INRAE, UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, Colmar

³INRAE, UE 1442 Vigne et Vin, Bordeaux



[Lien vers l'éditeur QUÆ](#)

L'Amérique, source de fléaux

C'est sur les bords de la mer Caspienne, il y a 8 000 ans, que l'homme domestique la vigne (*Vitis vinifera* L.) à partir de la lambrusque, une liane sauvage peuplant les lisières forestières. L'histoire millénaire de la domestication de la vigne, longtemps confondue avec celle des civilisations d'Asie mineure et de Méditerranée, s'illustre aujourd'hui dans la diversité des cépages (>10 000) recensés par les ampélographes. Si la viticulture connaît des fortunes diverses selon les périodes, les événements survenus dans la seconde moitié du XIX^{ème} siècle sont certainement ceux qui la transformèrent le plus.

A cette époque, les botanistes s'intéressent aux espèces sauvages de *Vitis* d'Amérique du nord pour leurs qualités ornementales. Un grand nombre d'entre-elles sont ainsi introduites dans les collections des jardins botaniques et les serres de toute l'Europe. Malheureusement, avec ces plantes arrivent aussi des parasites auxquels la vigne européenne (*Vitis vinifera*) se révèle extrêmement sensible. Tout d'abord l'oïdium (*Erysiphe necator*) est découvert en 1845 dans une serre de Margate en Angleterre. Le champignon se propage rapidement dans toute l'Europe, le climat méditerranéen lui étant particulièrement favorable. Un malheur n'arrivant jamais seul, c'est au tour du phylloxéra (*Daktulosphaera vitifoliae*) de faire son apparition (1861). Ce minuscule puceron qui s'attaque aux racines de la vigne, donne bien du fil à retordre aux entomologistes avant son identification en 1868 par Planchon et Riley (Carton et al. 2007). La série se poursuit avec le mildiou (*Plasmopara viticola*) en 1878 et le black-rot (*Guignardia bidwellii*) en 1885 dont les apparitions causent à leur tour d'immenses pertes de récoltes. La crise phylloxérique reste néanmoins la plus terrible modifiant pour longtemps les contours du vignoble qui a déserté les coteaux pour s'installer dans les plaines. Sur les 2,5 millions d'hectares plantés en France en 1875, il n'en reste plus que 1,70 millions en 1900. Les conséquences économiques et sociales de cette crise sont d'autant plus considérables que la France est alors le premier producteur de vin au monde.

Savants et viticulteurs de tous horizons se mobilisent pour tenter d'endiguer la progression de ces nouveaux parasites venus du nouveau Monde. Cette période d'innovation tous azimuts débouche sur l'emploi du soufre pour lutter contre l'oïdium, une découverte fortuite due à Kyle en Angleterre. Quelques années plus tard (1854), Henri Marès met au point la technique de soufrage à sec, méthode toujours utilisée pour le traitement des vignes contre l'oïdium (Marès, 1858). La bouillie bordelaise, remède à base de sulfate de cuivre mis au point par Alexis Millardet en 1885, s'avère quant à elle très efficace en traitement préventif contre le mildiou (Millardet et Gayon 1887). La chimie ne remporte cependant pas que des victoires. L'utilisation du sulfure de carbone injecté dans le sol à grand renfort de main d'œuvre ne permet pas de venir à bout du phylloxéra. La voie chimique prônée par les "sulfuristes" s'oppose à celle des "américanistes" qui observent que les vignes américaines sont capables de résister aux nouveaux parasites. Mais introduire des vignes américaines pour sauver la vigne française, alors que ces mêmes plants sont à l'origine de l'arrivée des parasites, est, à l'époque, une idée iconoclaste !

Les vignes américaines à la rescousse

C'est à nouveau Alexis Millardet, professeur à la faculté de Bordeaux, qui ouvre la voie de la création variétale en réalisant les premières hybridations entre espèces sauvages de *Vitis* américains et cépages européens (Millardet 1891). Au début du XX^{ème} siècle, une vingtaine d'hybrideurs français réalisent un travail considérable de création variétale, en utilisant les espèces américaines du genre *Vitis* comme sources de résistance (Schneider, 2006). Leurs travaux ont permis la création de nombreuses variétés appelées « hybrides producteurs directs », résistantes à la fois à l'oïdium, au mildiou et au phylloxéra. Parallèlement, en 1871 Gaston Bazille est le premier à proposer d'utiliser les vignes américaines comme porte-greffes pour lutter contre le phylloxéra. Au début, ces essais de greffage se soldent par de nombreux échecs, alimentant alors des querelles, parfois violentes, entre "sulfuristes" et "américanistes". C'est pourtant bien cette solution qui permet la

renaissance du vignoble européen : 30 ans de recherches acharnées sont nécessaires pour aboutir à la sélection de porte-greffes adaptés à la diversité des sols et des climats du vignoble français. Ces porte-greffes sont aujourd'hui utilisés dans tous les vignobles du monde (à l'exception notable des vignobles australien et chilien). Il est également remarquable de constater que plus de 150 ans après leur déploiement, les résistances au phylloxéra restent efficaces. Elles sont certainement parmi les résistances les plus durables de l'histoire de la protection des plantes !

Si l'amélioration variétale constitue une réussite dans la lutte contre le phylloxéra, il n'en est pas de même pour les hybrides producteurs directs. Malgré les espoirs qu'ils suscitent pour la reconstitution du vignoble, leur succès s'estompera au cours de la première moitié du XX^{ème} siècle. Les raisons tiennent à leurs niveaux de résistance parfois insuffisants et, surtout, à leurs mauvaises qualités œnologiques (goûts "foxés"). Cette réputation conduit à leur interdiction dans les AOC en 1951. S'ils couvraient encore 30% du vignoble français en 1958, seuls 20 hybrides furent inscrits au catalogue à sa création en 1971. Ils représentent aujourd'hui moins de 1% de l'encépagement français (Baco blanc en Armagnac, Villard blanc, etc).

Avec l'arrivée des fongicides de synthèse comme moyen de lutte dans les années 1960-70, la filière a finalement délaissé la création de nouvelles variétés qui a été réorientée vers l'amélioration qualitative par sélection clonale. Les successeurs des "sulfuristes" trouvent avec le développement de la chimie le moyen de regagner le devant de la scène, et pour longtemps. La gestion des maladies aériennes repose toujours sur les pesticides minéraux et de synthèse et la vigne est une des cultures recourant le plus aux produits phytosanitaires (Muthmann, 2007 ; Butault et al., 2010). Cependant, les externalités liées à l'usage des pesticides conduisent aujourd'hui la filière à se réengager dans la recherche de solutions alternatives. Après des années de disgrâce, la création variétale redevient une priorité et les programmes de sélection de cépages résistants aux maladies sont remis sur le devant de la scène.

Créer les cépages de demain

Les stratégies de gestion des maladies basées sur l'amélioration des plantes nécessitent avant tout de dépasser les défauts cultureux et qualitatifs des hybrides producteurs directs. Cela est possible en multipliant les étapes de croisement et de sélection, de manière à augmenter les chances de générer des recombinaisons favorables entre caractères de résistances aux maladies, performances culturales et qualité du vin. La multiplicité des objectifs poursuivis rend la sélection de nouvelles variétés longue et fastidieuse, des difficultés à la hauteur de l'espoir qu'elles font naître.

Chez la vigne, plusieurs sources de résistance aux maladies fongiques ont été identifiées au sein d'espèces de *Vitis* d'origine américaine, comme évoqué précédemment, mais également d'origine asiatique (Boubals, 1959 ; Staudt et Kassemeyer, 1995; Cadle-Davidson, 2008). Ces vignes sauvages sont génétiquement proches de la vigne cultivée et peuvent transmettre leurs caractères de résistance par voie de croisements. L'analyse génétique de ces caractères a énormément progressé au cours des vingt dernières années, et de nombreux facteurs de résistance au mildiou ou à l'oïdium ont pu être identifiés et positionnés sur le génome de la vigne. Une liste compilée avec les références est disponible sur <http://www.vivc.de/index.php?r=loci%2Findex> . Pour l'ensemble de ces facteurs, des marqueurs génétiques spécifiques ont été développés, ce qui permet par un simple test moléculaire de savoir si un facteur donné est présent ou non dans un parent potentiel ou parmi les individus d'une descendance.

Ces connaissances nouvelles constituent des ressources précieuses pour le sélectionneur. Il peut dorénavant non seulement établir les plans de croisements en fonction de la source et de la complémentarité des facteurs de résistance, mais également trier les descendance très rapidement en recourant à la sélection assistée par marqueurs (SAM)

(Eibach *et al.*, 2007). Cette technique est particulièrement efficace (i) pour réaliser l'introgression d'un facteur de résistance provenant d'une vigne sauvage dans le fond génétique de la vigne cultivée (*Vitis vinifera*) par des cycles rapides de rétrocroisements et (ii) pour le pyramidage, c'est-à-dire le cumul, de plusieurs facteurs de résistance à un agent pathogène donné dans un même individu (voir ci-dessous).

En pratique, tous les facteurs de résistance identifiés ne sont pas pertinents ou faciles à utiliser dans un programme de création variétale, soit en raison d'un faible effet de protection, soit en raison d'un niveau d'introgression insuffisant. Finalement, seuls trois ou quatre d'entre eux sont réellement mobilisés dans les programmes de création variétale poursuivis par les obtenteurs européens pour la création de variétés résistantes aux maladies fongiques (Tableau 1). Des facteurs identifiés plus récemment sont en cours d'introgression et viendront progressivement compléter le panel utilisable par les sélectionneurs.

Tableau 1. Facteurs de résistance au mildiou et à l'oïdium utilisés par les obtenteurs européens.
 Chr. : numéro du chromosome du génome de la vigne où se trouve le facteur de résistance.

Maladie (agent pathogène)	Facteur de résistance	Espèce sauvage d'origine	Chr.	Niveau de résistance	Niveau d'introgression*
Mildiou (<i>Plasmopara viticola</i>)	Rpv1	<i>Vitis rotundifolia</i>	12	élevé	4 ou 5
	Rpv3	<i>Vitis rupestris</i>	18	moyen	5
	Rpv10	<i>Vitis amurensis</i>	9	élevé	3
	Rpv12	<i>Vitis amurensis</i>	14	élevé	3 ou 4
Oïdium (<i>Erysiphe necator</i>)	Run1	<i>Vitis rotundifolia</i>	12	total	4 ou 5
	Ren1	<i>Vitis vinifera</i>	13	élevé	Vigne cultivée
	Ren3	<i>Vitis rupestris</i>	15	moyen	5

* Le niveau d'introgression est représenté par le nombre de cycles de croisement/rétrocroisement en démarrant de l'hybride F1. Selon la source de résistance, il faut au moins 3 cycles pour éliminer les défauts cultureux et qualitatifs majeurs de l'espèce sauvage.

Outre le choix des facteurs de résistances sur la base de leur efficacité, leur combinaison dans une même variété (pyramidage) est une stratégie qui permet d'améliorer la durabilité de la résistance des nouveaux cépages (Merdinoglu *et al.*, 2018). Cette pratique, fortement recommandée par une résolution de l'Organisation Internationale de la vigne et du vin (OIV, 2013), est facilitée par les nouveaux outils de sélection (SAM) (Eibach *et al.* 2007).

INRAE a engagé son programme ResDur en 2000, avec l'ambition de développer une gamme de variétés durablement résistantes au mildiou et à l'oïdium adaptée aux grands bassins viticoles français (Schneider *et al.* 2018). Ce programme repose sur l'utilisation de géniteurs de résistance complémentaires, dont des lignées d'introgression issues de *V. rotundifolia* par rétrocroisements successifs (Bouquet, 1986) constituent le pivot. Il met en œuvre un schéma de sélection organisé en trois étapes : (i) une sélection précoce basée sur le tri des descendances par SAM afin de ne retenir que les individus pyramidés pour les facteurs de résistance portés par les deux parents ; (ii) une sélection intermédiaire appuyée sur un réseau d'essais au sein des Unités Expérimentales INRAE (Colmar, Bordeaux, Angers, Montpellier) ; (iii) une sélection finale dans le réseau d'essais de Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale (VATE), de portée nationale, en collaboration avec l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV) et des organismes de développement. Les deux dernières étapes portent sur l'évaluation de l'ensemble des aptitudes culturelles et de la qualité sensorielle des vins, à partir de vinifications en très petits ou petits volumes.

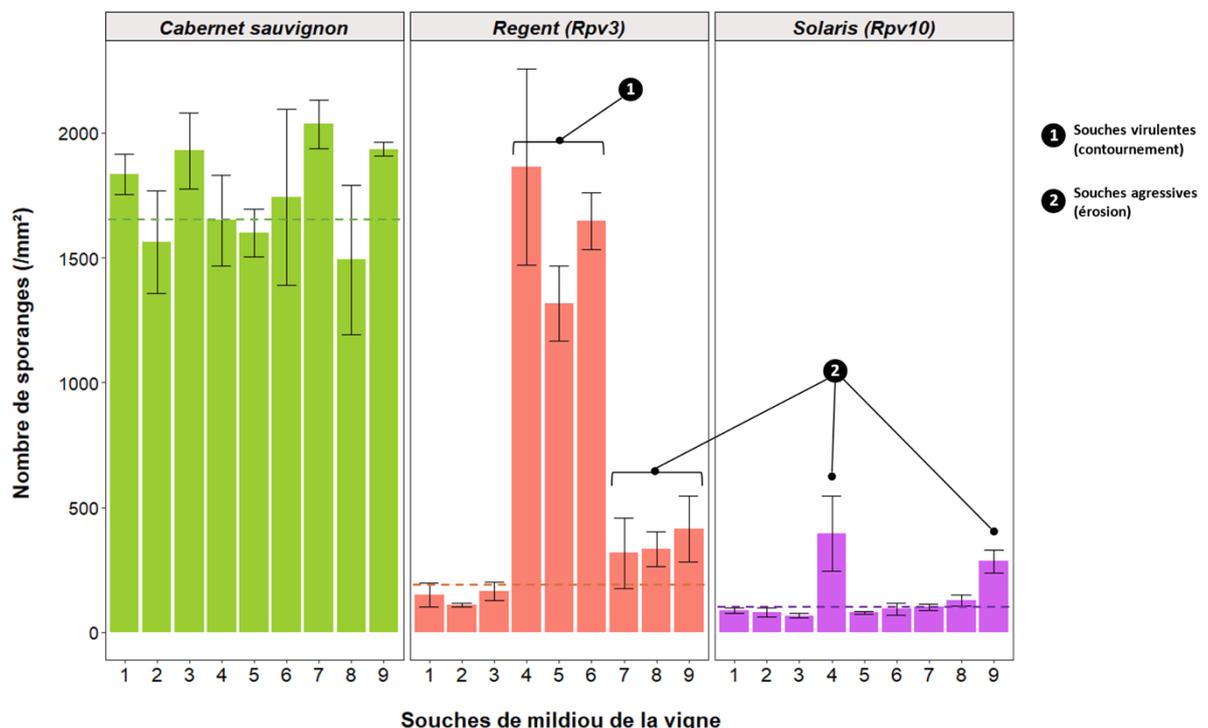
Un premier aboutissement de ce programme a été l'inscription au catalogue français des variétés Artaban, Floreal, Vidoc et Voltis en 2018 (<http://observatoire-cepages-resistants.fr/les-fiches-cepages-resistants/>). Ces variétés découlent de croisements entre des obtentions "Bouquet" et des variétés du Julius Kühn Institut (Siebeldingen, Allemagne) principalement "Regent", caractérisées par un niveau d'introggression élevé. Leur résistance à l'oïdium est totale, déterminée par deux facteurs de résistance (*Run1* et *Ren3*) et leur résistance au mildiou est forte, également déterminée par deux facteurs de résistance (*Rpv1* et *Rpv3*). Une vingtaine d'autres variétés relevant du programme ResDur est attendue d'ici 2025, ce qui permettra à terme de proposer une offre variétale diversifiée à la filière, répondant aux besoins des principaux bassins viticoles français, dans un contexte de changement climatique.

En offrant désormais la possibilité de produire facilement des vins sans pesticides, les variétés résistantes peuvent apporter une plus-value inédite au produit (Fuentes Espinoza et al., 2018). Néanmoins, la qualité organoleptique des variétés et le maintien de la typicité des vins restent un enjeu majeur dans un paysage viticole français largement dominé par les vins d'appellation d'origine contrôlée. Aujourd'hui, le déploiement des variétés résistantes est engagé pour la production de vins de catégorie "Vin de France" ou "Indication Géographique Protégée". De nouveaux programmes de création de variétés résistantes à typicité régionale sont portés par plusieurs interprofessions viticoles pour répondre à la problématique des Appellations d'Origine Protégée. INRAE, IFV et les Organisations Interprofessionnelles se sont associés dès 2015 pour engager une douzaine de programmes à déclinaison régionale (Audeguin, 2018). L'objectif est de créer de nouveaux cépages cumulant typicité régionale et résistances aux maladies fongiques, afin de transférer et démultiplier les résultats prometteurs du programme ResDur. En parallèle, la réglementation des AOP s'est assouplie avec l'intégration dans les cahiers des charges d'une nouvelle catégorie appelée "cépages accessoires d'intérêt à fin d'adaptation". A titre expérimental, certains cépages de *Vitis vinifera* sélectionnés pour chaque appellation pourront être plantés et couvrir jusqu'à 5% de l'encépagement d'une exploitation et 10% des volumes assemblés (directive INAO-DIR-2018-01 du 25 octobre 2018). Les variétés choisies par les AOP seront testées pendant 10 ans reconductibles. Les viticulteurs eux-mêmes auront la responsabilité du suivi des parcelles plantées et devront transmettre les informations recueillies aux ODG (Organismes de Défense et de gestion). L'intégration des nouvelles variétés résistantes au mildiou et à l'oïdium obtenues par hybridation dans cette nouvelle catégorie requièrent encore des adaptations réglementaires à l'échelle européenne.

Des résistances majeures à effets partiels

Les gènes de résistance (R) sont le plus souvent impliqués dans des interactions gène-pour-gène avec les gènes d'avirulence (Avr) des agents pathogènes (chapitres 2 et 3). Ainsi, les plantes exprimant un produit spécifique du gène R sont résistantes à l'égard d'un agent pathogène qui exprime le produit du gène Avr correspondant. Si une mutation affecte le motif moléculaire du côté de l'agent pathogène, sa reconnaissance par la plante est supprimée et le gène R perd totalement son efficacité. On parle alors de contournement. Parallèlement, certaines résistances partielles peuvent subir des phénomènes d'érosion liés à la sélection de souches agressives d'agents pathogènes présentant des temps de latence plus courts ou bien des taux de sporulation plus élevés que la moyenne (Figure 1).

Figure 1. Contournement et érosion des résistances de la vigne au mildiou. Le graphique représente le taux de sporulation évalué au laboratoire de 9 souches de mildiou collectées au vignoble sur 3 variétés de vigne incluant un cépage sensible (Cabernet sauvignon) et deux variétés partiellement résistantes (Regent, Solaris). Les lignes pointillées indiquent le niveau de sporulation moyen de la population de mildiou évalué sur >100 souches. Les souches 4, 5 et 6 sont virulentes sur Regent. Les souches 7, 8, 9 présentent un niveau d'agressivité plus grand sur Regent et les souches 4 et 9 sur Solaris. Malgré cette érosion, les résistances restent efficaces tant que le contournement n'est pas observé.



Chez la vigne, la grande majorité des facteurs de résistance à l'oïdium (facteurs *Ren*) et au mildiou (facteurs *Rpv*) est sous-tendue par des loci à effets quantitatifs (QTL) majeurs situés dans des régions génomiques riches en gènes de résistance de type LRR (Mestre *et al.*, 2013). Il faut noter l'exception du gène *Run1* de résistance à l'oïdium dont le phénotype est qualitatif, c'est-à-dire qu'il produit une résistance totale (Tableau 1). Du point de vue de leur héritabilité, ces résistances majeures sont monogéniques. Par contre, du point de vue de leur phénotype, elles sont quantitatives (partielles), c'est-à-dire que les souches d'agents pathogènes arrivent toutes à se développer un peu sur les plantes portant ces résistances.

Une dichotomie trop simpliste a longtemps prévalu dans la typologie des résistances en associant de façon univoque l'héritabilité d'un gène de résistance (mono- ou polygénique), son expression phénotypique (virulence ou agressivité) et la dynamique d'adaptation des agents pathogènes (contournement soudain ou érosion progressive). De nombreux auteurs ont montré la nécessité de dépasser ce modèle (e.g. Niks *et al.* 2016) et les données acquises sur le comportement des gènes de résistances au mildiou et à l'oïdium confortent cette analyse (chapitre 4).

Des agents pathogènes qui s'adaptent

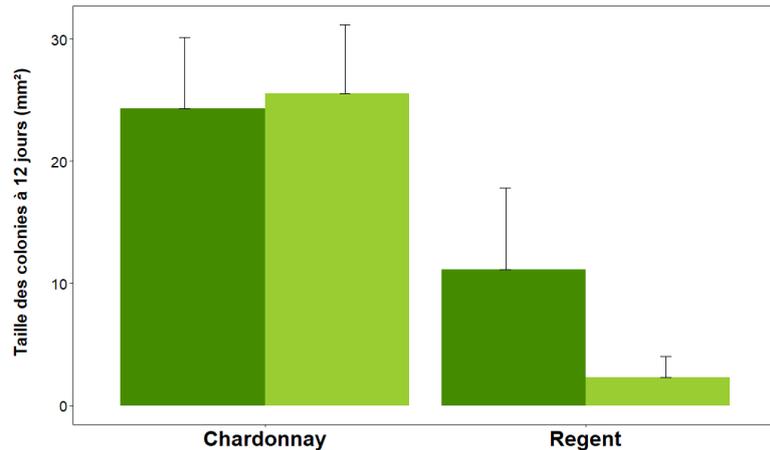
La combinaison d'informations sur le système de reproduction des agents pathogènes, la taille efficace de leurs populations et leur capacité de dispersion permet d'estimer leur potentiel évolutif (Mc Donald et Linde, 2003). Son application à l'oïdium et au mildiou de la vigne leur assigne un fort potentiel évolutif. Leurs cycles de vie combinent en effet plusieurs caractéristiques favorisant une adaptation rapide : production d'une grande quantité de spores, bonnes capacités de dispersion et reproduction sexuée annuelle. Ceci est d'ailleurs illustré par la vitesse à laquelle ces deux agents pathogènes ont déjà répondu à la pression exercée par les fongicides en développant des résistances à presque toutes les molécules utilisées (Chen et al. 2007, Delmas et al. 2017). Les processus évolutifs gouvernant l'adaptation des agents pathogènes aux pesticides étant les mêmes que ceux qui entraînent l'émergence de génotypes adaptés aux gènes de résistance (chapitre 11), la crainte d'une adaptation des populations de mildiou et d'oïdium semble justifiée.

Des adaptations à la résistance ont d'ailleurs déjà été observées malgré une diffusion encore très restreinte des variétés de vigne résistantes. Pour le mildiou, un premier contournement a été décrit sur le facteur *Rpv3* présent dans les variétés Bianca et Regent (Perressoti et al. 2010, Delmotte et al. 2014). Les données montrent que cette virulence peut apparaître en moins de cinq années dans une parcelle plantée avec la variété Regent (Delmotte et al. 2014). Elles suggèrent également que ces événements ne sont pas exceptionnels, des contournements *a priori* indépendants ayant été observés dans des régions viticoles aussi éloignées que Bordeaux et Tokay (Hongrie).

D'autres cas d'adaptation des populations de mildiou à la résistance ont depuis été confirmés. Delmas et al. (2016) observent une érosion en cours des résistances partielles au mildiou. Ils mettent en évidence que les isolats collectés sur variétés résistances sont significativement plus agressifs (temps de latence plus court, sporulation plus forte) que ceux issus de variétés sensibles. Il s'agit d'une adaptation des populations de mildiou qui peut conduire à une réduction de l'efficacité potentielle de la résistance de près de 26% sur certaines variétés. Cette évolution des populations de mildiou ne semble pas avoir de conséquences pour les cépages (sensibles) majoritairement cultivés actuellement. En effet, sur Cabernet Sauvignon, cépage sensible, les souches de mildiou ne paraissent pas plus agressives que les souches dites « naïves ».

Du côté de l'oïdium, le contournement d'une variété présentant le gène *Run1* issu de *V. rotundifolia* par un isolat d'oïdium originaire du sud-est de l'Amérique du Nord a également été décrit (Feechan et al., 2013a, 2013b, 2015). Un tel contournement n'a jamais été observé en Europe où les populations d'oïdium sont génétiquement beaucoup moins diverses. En revanche, des données non publiées montrent une érosion significative de la résistance conférée par *Ren3* et *Ren9*, des facteurs présents beaucoup de variétés déployées en Europe (Figure 2).

Figure 2. Érosion de l'efficacité des résistances à l'oïdium de la vigne évaluée en conditions contrôlées. Les isolats collectés sur des variétés résistantes (vert foncé; n=13) sont plus agressifs sur Regent (variété porteuse du gène de résistance *Ren3* et *Ren9*) que les isolats collectés sur des cépages sensibles de *Vitis vinifera* (vert clair; n=8). Leur agressivité n'est en revanche pas significativement différente lorsqu'ils sont inoculés sur Chardonnay, cépage sensible.



Les variétés cumulant plusieurs facteurs de résistances sont-elles plus durables ? Le suivi sur sept années de la variété Artaban (cumulant les facteurs *Rpv1* et *Rpv3*) apporte de premiers éléments de réponses. En quelques années, les populations de mildiou qui se développent faiblement sur cette variété sont devenues virulentes sur *Rpv3*. Pour comprendre ce résultat, il faut se rappeler que la plupart des hybrides producteurs directs déployés dans la première moitié du XX^{ème} siècle portaient ce facteur de résistance, ce qui a laissé le temps au mildiou de s'adapter à cette pression de sélection. Nous pouvons donc supposer que la virulence à *Rpv3* est largement présente dans les populations. Ces observations questionnent la durabilité des variétés pyramidées utilisant *Rpv3*. En effet l'existence de génotypes pré-adaptés à l'une des composantes d'une pyramide constitue un tremplin évolutif facilitant grandement son contournement (chapitre 16). Toutefois il est important de garder à l'esprit que sur le terrain la variété d'Artaban garde toute son efficacité, le facteur de résistance *Rpv1* n'ayant pas été contourné au vignoble.

Ces résultats sont cohérents avec les données biogéographiques de la co-évolution entre la vigne et ses agents pathogènes. En effet, dans leur bassin d'origine, l'oïdium et le mildiou sont tous deux capables d'infecter une large gamme d'espèces de *Vitis* américains (Brewer et al. 2010 ; Rouxel et al. 2013). Les études génétiques montrent que la diversité de ces deux agents pathogènes est plus importante en Amérique du Nord qu'en Europe (Chen et al. 2007 ; Frenkel et al. 2011; Fontaine et al. 2013). Pour l'oïdium, les populations du bassin d'origine paraissent faiblement structurées et peu spécialisées sur leurs hôtes, à l'exception d'un sous-groupe de populations capables d'infecter *Vitis rotundifolia* - espèce dont est issue la résistance totale conférée par *Run1*. La souche capable de contourner ce gène (Feechman et al. 2013) appartient certainement à cette population. Pour le mildiou, plusieurs espèces cryptiques ont été décrites en Amérique du Nord, avec des niveaux de spécialisation différents sur les *Vitis* sauvages américains (Rouxel et al. 2013, 2014). Nous savons aujourd'hui qu'une seule de ces espèces de mildiou a été introduite en Europe, celle qui infectent les *Vitis aestivalis* sauvages. Dans le cas des agents pathogènes exotiques, la durabilité des résistances dépend non seulement du choix des stratégies de sélection et de déploiement mais aussi de notre capacité à anticiper les contournements liés à de nouvelles introductions. Il s'agit d'une question de recherche ouverte qui offre un indéniable parallèle avec nos interrogations actuelles sur les émergences de pandémies, notamment dans les populations animales. A ce jour, une incertitude forte demeure sur les conséquences qu'auraient de nouvelles introductions d'oïdium et de mildiou en Europe.

La nécessaire adaptation des itinéraires de culture

L'usage de variétés de vignes résistantes au mildiou et à l'oïdium représente une rupture majeure qui pourrait, à terme, transformer les itinéraires techniques viticoles mais également l'élaboration des vins, l'image du produit et ses possibilités de valorisation (Hochereau et al., 2015).

Ces nouvelles variétés sont sélectionnées pour leur résistance aux maladies fongiques mais également pour certaines caractéristiques agronomiques (phénologie, fertilité, production, port du végétal, etc.) permettant l'obtention d'un vin de qualité. Néanmoins, de nombreuses connaissances sur le comportement de ces nouvelles variétés restent à acquérir pour permettre leur déploiement dans différents systèmes de culture et situations agro-climatiques. Il s'agit notamment de leurs réponses aux modes de taille et de conduite mais aussi leur interaction avec la gamme des porte-greffes couramment utilisés. De même, leur réponse à la contrainte hydrique doit également être documentée car elle constitue un enjeu majeur d'adaptation de la viticulture au changement climatique (Schultz et Stoll, 2010). Enfin, l'aptitude à la mécanisation est également un élément déterminant pour un plus large usage.

Une expérimentation menée à INRAE depuis 2011 permet de comparer un système viticole utilisant une variété résistante (Artaban) à des systèmes conduits en Agriculture Biologique (Delière et al., 2018). Les résultats obtenus sur 6 années montrent que la résistance variétale permet une réduction de l'usage des fongicides de plus de 80%. Avec cette variété possédant une résistance totale à l'oïdium et partielle au mildiou, la maîtrise de ces maladies reste très bonne après plusieurs années, mais on observe souvent une progression des symptômes de mildiou sur le feuillage en fin de saison, plus précoce les années où les conditions climatiques sont favorables à la maladie. Le mildiou est également capable d'accomplir l'intégralité de son cycle de vie en produisant, sur toutes les variétés résistantes, les formes sexuées de conservation hivernale en aussi grand nombre que sur les cultivars sensibles de *V. vinifera* (Delbac et al. 2019). Par ailleurs, la recrudescence de certaines maladies secondaires (anthracnose, érinose) a été observée, le développement de certaines, comme le black-rot, entraînant parfois des pertes de récolte significatives en l'absence de traitements phytosanitaires suffisants.

Ainsi, l'intégration de la résistance variétale dans les systèmes de culture viticole, tout en cherchant à minimiser le recours aux fongicides, modifie en profondeur les objectifs de protection contre les bioagresseurs. Il faut désormais (i) compléter l'efficacité des gènes de résistance, dans le cas de résistances partielles, pour atteindre les objectifs de production en toutes situations, (ii) maîtriser les bioagresseurs non ciblés par les gènes de résistance, et en particulier les maladies qui étaient habituellement contrôlées par les traitements fongicides et (iii) favoriser la durabilité des résistances en limitant les tailles de populations de mildiou et d'oïdium.

Atteindre ces multiples objectifs implique de repenser les stratégies de protection. Les modèles de prévision des risques doivent être adaptés aux dynamiques épidémiques spécifiques des variétés résistantes afin de positionner au mieux les méthodes de protection. De plus, l'utilisation de microorganismes ou d'extraits végétaux ayant une action fongicide ou stimulant les défenses naturelles des plantes pourraient être mieux valorisées (Pertot et al., 2017). Si ces produits possèdent une efficacité inférieure à celle des fongicides, leur action pourrait avantageusement compléter celle des gènes de résistance. D'autres méthodes culturelles basées sur la limitation de l'inoculum primaire, seraient également très pertinentes dans ces nouveaux systèmes de culture. Ainsi, l'élimination des organes de la vigne portant les sources d'inoculum est une méthode prophylactique déjà utilisée avec succès pour la gestion de la tavelure du pommier (Gomez et al., 2007). Outre la limitation de la pression parasitaire qu'entraîne la suppression de l'inoculum primaire, cette méthode pourrait limiter le risque de recombinaison entre facteurs de virulence durant les phases de reproduction sexuée, et donc favoriser la durabilité des variétés pyramidées.

L'utilisation de la résistance variétale en viticulture n'est pas le Graal. Elle doit au contraire être considérée comme un levier supplémentaire qui, combinée à d'autres méthodes de protection, permet de construire des systèmes productifs et durables. La conception des systèmes de culture utilisant les variétés résistantes nécessite donc l'acquisition des connaissances complémentaires sur le comportement des variétés, les dynamiques épidémiques et les interactions avec d'autres méthodes de gestion des bio-agresseurs. Elle relève de multiples disciplines, qui vont de la génétique à l'agronomie, en passant par les sciences économiques et sociales. Ces nouveaux systèmes viticoles doivent être co-construits avec la profession afin de prendre en compte les contraintes de la filière et favoriser le transfert de bonnes pratiques auprès des utilisateurs. Les viticulteurs qui testent dans les conditions de la pratique ces nouvelles variétés, ont également un rôle essentiel à jouer dans l'acquisition des données à large échelle et le partage des connaissances.

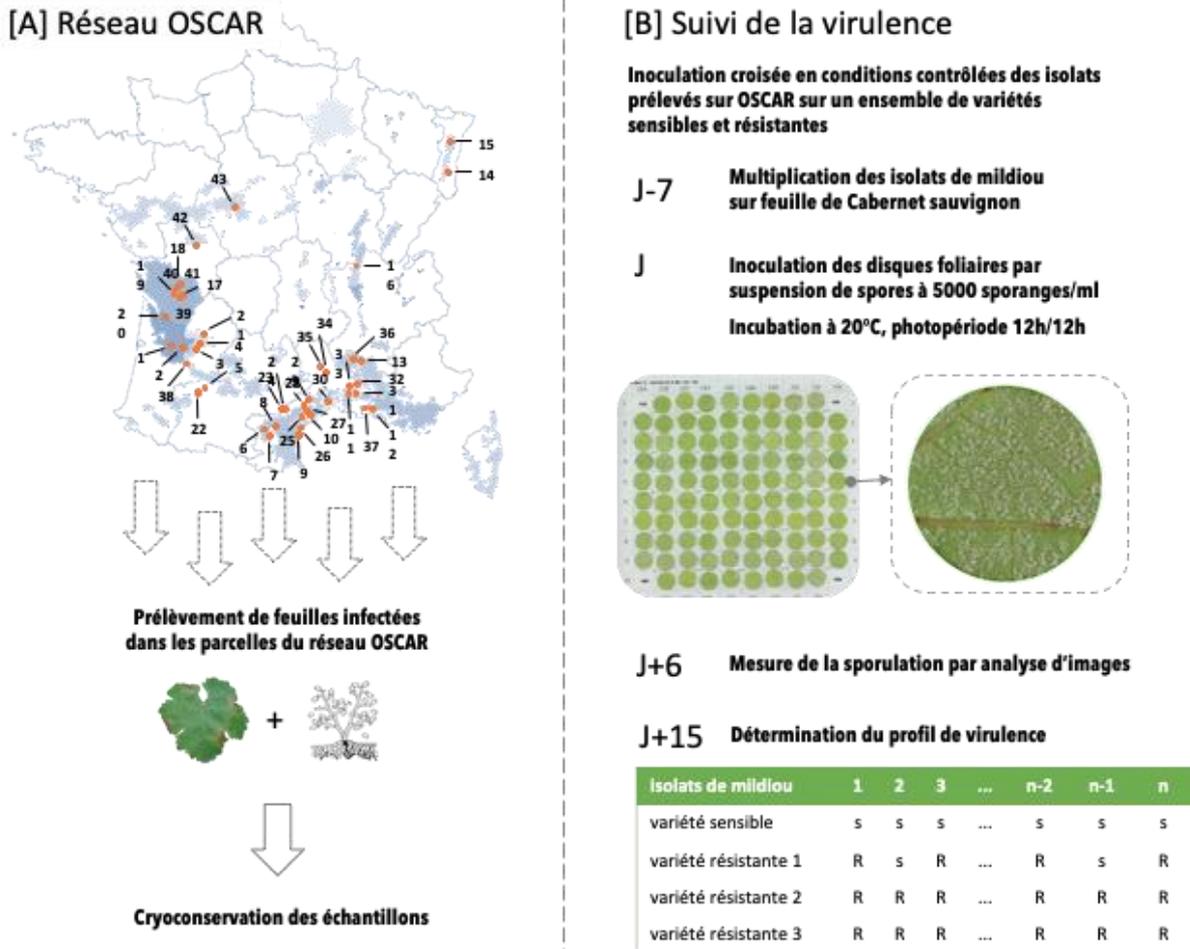
La vigne sous surveillance

Promouvoir les sciences participatives est une des ambitions de l'Observatoire national du déploiement des Cépages Résistants (OSCAR, <http://observatoire-cepages-resistants.fr/>). Mis en place en 2017 par INRAE et l'IFV, OSCAR s'appuie sur les viticulteurs et les structures professionnelles qui expérimentent les variétés résistantes en conditions de production. OSCAR est un observatoire ouvert dont l'objectif est de recueillir des données dans une diversité de situations agro-climatiques et de systèmes de culture la plus large possible. En 2019, l'observatoire était constitué de 89 parcelles réparties sur 43 sites en France (Figure 3A). Pas moins de 23 variétés résistantes issues des programmes de sélection d'instituts européens sont suivies sur le terrain. OSCAR a deux missions principales : i) l'organisation de la surveillance collective du déploiement afin d'anticiper les risques liés à l'évolution des populations de mildiou et d'oïdium et à l'émergence de nouvelles problématiques sanitaires et ii) le partage d'expériences sur le comportement des variétés résistantes dans différents systèmes de culture afin d'aider les viticulteurs à construire ces nouveaux itinéraires techniques.

Tout au long de la période végétative, des notations sur les maladies sont réalisées par les partenaires selon un protocole standardisé. Ces notations portent sur les bio-agresseurs ciblés par la résistance (mildiou et oïdium) afin d'identifier en particulier d'éventuels contournements de résistance. Les bio-agresseurs non ciblés par la résistance (black-rot, érinose, phylloxéra, anthracnose, excoriose et botrytis) sont également suivis afin de surveiller la recrudescence de certaines maladies secondaires habituellement maîtrisées par les traitements ou peu problématiques sur variétés sensibles.

Parallèlement à cette surveillance de terrain, l'évolution des populations de mildiou est évaluée au laboratoire (Figure 3B). Pour cela, des isolats de mildiou sont prélevés au vignoble sur des variétés résistantes et sur des cépages sensibles (*Vitis vinifera*). Les isolats collectés sur plantes sensibles constituent une population de référence vis-à-vis de laquelle une augmentation potentielle de l'agressivité des populations de mildiou prélevées sur variétés résistantes peut être testée. Les isolats prélevés sont conservés et testés tous les ans au laboratoire pour évaluer leur agressivité.

Figure 3. Organisation de la surveillance dans le cadre de l'observatoire national du déploiement des cépages résistants (OSCAR). [A] Réseau de 89 parcelles réparties sur 43 sites et incluant 23 variétés résistantes à l'oïdium et au mildiou. Les populations de mildiou sont échantillonnées chaque année, et les isolats mis en collection par INRAE Bordeaux (cryoconservation). [B] Le profil de virulence de n isolats collectés sur le réseau OSCAR est caractérisé par une inoculation croisée en conditions contrôlées des isolats sur une sélection de variétés sensibles et résistantes. R : l'interaction est incompatible, l'agent pathogène est contrôlé par la résistance; s : l'interaction est compatible, l'agent pathogène se développe normalement.



Au-delà de cette surveillance, l'observatoire collecte des informations sur le comportement agronomique des variétés résistantes au mildiou et à l'oïdium dans différents systèmes de culture et différents contextes agronomiques. Les itinéraires techniques mis en œuvre sur ces parcelles sont également recueillis, et notamment les traitements phytosanitaires (date, produit, dose, cibles et règles de décisions associées).

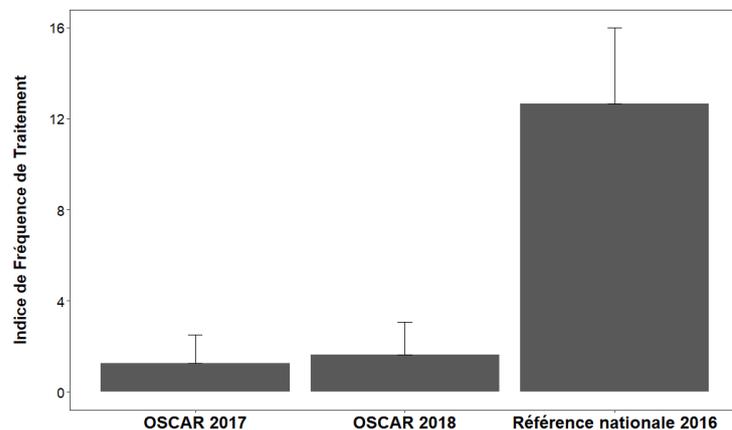
Après trois années de suivi au vignoble, aucune perte d'efficacité des résistances déployées n'a été observée. Pour le mildiou, des symptômes sont apparus sur les parcelles de 2017 à 2019 et de façon plus marquée en 2018, du fait de la forte pression épidémique. Si les fréquences de symptômes ont pu être importantes en 2018, les intensités d'attaques sont restées faibles et n'ont pas entraîné de pertes de récolte significatives (Miclot et al., 2019). En 2019, ces observations de terrain ont été complétées par des analyses de laboratoire conduites sur 120 isolats de mildiou. Les isolats testés provenaient de deux variétés ResDur pyramidant *Rpv1* et *Rpv3* (Floreal et Vidoc), et deux variétés "Bouquet" avec *Rpv1* (1D10 et 3159-2-12b). La parcelle de 3159-2-12b a été plantée en 2013 dans l'Aude, celle de Floreal en 2015 dans le Gers, celle de Vidoc en 2016 dans le Gard, et celle de 1D10 en 2018 en Charentes. Ces isolats ont été inoculés sur des disques foliaires de quatre variétés : une

variété sensible (Cabernet Sauvignon), une variété portant *Rpv1* (Bouquet 3176-21-11N), une variété portant *Rpv3* (Regent) et une variété portant *Rpv1* et *Rpv3* (Artaban). Aucun contournement de la résistance conférée par *Rpv1* n'a été observé au laboratoire. Les résultats obtenus ont par contre confirmé la présence d'isolats agressifs et d'un petit nombre capable de contourner *Rpv3* (tous provenant des variétés ResDur).

Pour l'oïdium, aucun symptôme n'a été détecté au terrain sur les variétés INRAE (Bouquet et ResDur) porteuses du gène *Run1* conférant une résistance totale. Enfin, en ce qui concerne les maladies dites « secondaires » habituellement contrôlées par les fongicides anti-mildiou et anti-oïdium (black-rot, anthracnose), mais aussi les ravageurs comme l'érosine et le phylloxéra, aucun impact significatif n'a été montré sur les parcelles.

Le suivi des pratiques culturales confirme le fort potentiel de ces variétés pour réduire l'usage des produits phytosanitaires au sein des exploitations viticoles. Les indicateurs de fréquence de traitements (IFT) fongicides moyens obtenus sur 30 parcelles en 2017 et 32 parcelles en 2018 s'élevaient respectivement à 1,2 et 1,8 contre un IFT fongicide moyen de 12,65 pour la référence nationale de 2016 (Agreste, 2019). Cela correspond à une réduction de 90% de l'IFT fongicide en 2017 et de 80% en 2018 par rapport aux références nationales (Figure 4; Guimier et al., 2019 ; Miclot et al., 2019).

Figure 4. Moyenne et écart-type de l'Indicateur de fréquence de traitements (IFT) fongicides calculés sur les parcelles du réseau OSCAR en 2017 (n=30) et 2018 (n=32) et la référence nationale 2016 (Agreste, 2019).



Et demain ?

Près d'un demi-siècle après l'élimination des hybrides producteurs directs du paysage viticole, les recherches en amélioration variétale de la vigne n'ont jamais autant été d'actualité. La reprise des programmes de sélection en Europe a permis à une nouvelle génération de variétés résistantes aux maladies de voir le jour. Ces cépages, en plus d'être résistants aux maladies, disposent de qualités agronomiques et organoleptiques proches de celles des cultivars de *V. vinifera*. Avec ces nouvelles variétés, un nouveau chapitre de l'histoire de la viticulture est en train de s'écrire.

Leur déploiement doit s'accompagner d'une surveillance pour s'assurer que les résistances de la vigne restent efficaces sur le long terme. C'est l'ambition de l'observatoire d'OSCAR. Constitué d'un réseau de parcelles en production, ce dispositif se fonde sur l'adhésion des premiers acteurs du déploiement, les viticulteurs. OSCAR s'est doté d'un outil pour faciliter la remontée de données en direct. L'objectif est de renforcer l'interactivité du réseau et de faciliter les retours d'expériences des viticulteurs sur ces variétés. Ce nouvel outil va non seulement permettre d'élargir le réseau en nombre de parcelles mais aussi d'étendre la remontée d'informations sur de nouvelles questions comme le potentiel de valorisation des variétés (qualité des vins). Si des réseaux de surveillance existent dans d'autres filières, OSCAR se distingue par l'importance des moyens d'observations qui sont mobilisés pour gérer les résistances mais également par sa dimension participative.

La qualité de l'épidémiologie-surveillance réalisée dans OSCAR repose sur notre capacité à réaliser des analyses de la virulence des populations d'agents pathogènes à large échelle. Malgré les nombreuses améliorations techniques, le suivi au laboratoire de la virulence des populations de mildiou est fortement limité par le débit des analyses (env. 100 isolats/an). Les recherches en cours sur la détection de facteurs génétiques impliqués dans l'évolution de la virulence permettent d'envisager la mise au point de marqueurs moléculaires pour suivre ces émergences dans les populations de mildiou. Lever ce verrou permettra d'augmenter significativement le monitoring des populations sur l'observatoire.

Nous ne sommes qu'au tout début du déploiement ; le paysage viticole est presque exclusivement constitué de cépages sensibles. Pour la recherche, cette situation est une opportunité unique de suivre, en temps réel, l'évolution des populations des agents pathogènes ciblés par la résistance. Grâce à l'observatoire OSCAR, les chercheurs peuvent étudier dans la durée les modifications génétiques et phénotypiques des populations de mildiou et d'oïdium, faisant de la vigne un cas d'école pour la compréhension des mécanismes évolutifs impliqués dans l'adaptation des agents pathogènes à la résistance des plantes.

Références bibliographiques

Audeguin L. 2018. Breeding programs: the new role of IFV and its department Geno-Vigne as a national technical institute. XII International Conference on Grapevine breeding and genetics, Bordeaux, France.

Boubals D. 1959. Amélioration de la résistance de la vigne au mildiou (*Plasmopara viticola* (Berk et Curt.) Berlese et de Toni) : recherche de géniteurs de résistance. Annales Amélioration Plantes, 6, 481–525.

Bouquet A. 1986. Introduction dans l'espèce *Vitis vinifera* d'un caractère de résistance à l'oïdium (*Uncinula necator*) issu de l'espèce *Muscadidnia rotundifolia* (Michx) Small CR 4^{ème} symp. International Genet. Vigne, Vérone, Italie, VigneVini, 13, 141-146.

Butault J.P., Dedryver C.A., Gary C., Guichard L., Jacquet F., Meynard J.M., Nicot P., Pitrat M., Reau R., Sauphanor B., Savini I. & Volay T. 2010. ECOPHYTO R&D : quelles voies pour réduire l'usage des pesticides. Rapport de synthèse. 91 p.

Cadle-Davidson L. 2008. Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. Plant Dis., 92, 1577–1584.

Cadle-Davidson L., Mahanil S., Gadoury D.M., Kozma P. & Reisch B.I. 2011. Natural infection of Run1-positive vines by naïve genotypes of *Erysiphe necator*. Vitis, 50(4), 173.

Carton Y., Sorensen C., Smith J. & Smith E. 2007. Une coopération exemplaire entre entomologistes français et américains pendant la crise du Phylloxera en France (1868–1895). Annales de la Société entomologique de France, 43(1), 103-125.

Delbac L., Delière L., Schneider C. & Delmotte F. 2019. Evidence for sexual reproduction and fertile oospore production by *Plasmopara viticola* on the leaves of partially resistant grapevine varieties. XII International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, Acta Hortic., 1248, 607-614.

Delière L., Guimier S., Petitgenet M., Goutouly J.P., Vergnes M., Dupin S., Davidou L., Christen M., Rochas A. & Guilbault P. 2018. Projet EcoViti Aquitaine : performances de systèmes viticoles à faible niveau d'intrants phytopharmaceutiques dans le vignoble bordelais. Innovations Agronomiques, 70, 37-54.

Delmas C.E., Fabre F., Jolivet J., Mazet I.D., Richart Cervera S., Delière L. & Delmotte F. 2016. Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. Evol. Appl., 709-725.

Delmas C.E., Dussert Y., Delière L., Couture C., Mazet I.D., Richart-Cervera S. & Delmotte F. 2017. Soft selective sweeps in fungicide resistance evolution: recurrent mutations without fitness costs in grapevine downy mildew. *Mol. Ecol.*, 26, 1936-1951.

Delmotte F., Mestre P., Schneider C., Kassemeyer H.H., Kozma P., Richart-Cervera S., Rouxel M. & Delière L. 2014. Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Inf. Genet. Evol.*, 27, 500-508.

Eibach R., Zyprian E.M., Welter L. & Töpfer R. 2007. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis*, 46, 120-124.

Feechan A., Anderson C., Torregrosa L., Jermakow A., Mestre P., Wiedemann-Merdinoglu S., Merdinoglu D., Walker A.R., Cadle-Davidson L., Reisch B., Aubourg S., Bentahar N., Shrestha B., Bouquet A., Adam-Blondon A.F., Thomas M.R. & Dry I.B. 2013a. Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. *Plant J.*, 76, 661–674.

Feechan A., Jermakow A.M., Ivancevic A., Godfrey D., Pak H., Panstruga R. & Dry I.B. 2013b. Host cell entry of powdery mildew is correlated with endosomal transport of antagonistically acting VvPEN1 and VvMLO to the papilla. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 26, 1138–1150.

Feechan A., Kocsis M., Riaz S., Zhang W., Gadoury D.M., Walker M.A., Dry I.B., Reisch B. & Cadle-Davidson L. 2015. Strategies for RUN1 deployment using RUN2 and REN2 to manage grapevine powdery mildew informed by studies of race specificity. *Phytopathology*, 105, 1104–1113.

Fontaine M.C., Austerlitz F., Giraud T., Labbé F., Papura D., Richard-Cervera S. & Delmotte F. 2013. Genetic signature of a range expansion and leap-frog event after the recent invasion of Europe by the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Mol. Ecol.*, 22, 2771-2786.

Fuentes Espinoza A., Hubert A., Raineau Y., Franc C. & Giraud-Héraud E. 2018. Resistant grape varieties and market acceptance: an evaluation based on experimental economics. *OENO One*, 52, 247-263.

Guimier S., Delmotte F., Miclot A.S., Fabre F., Mazet I., Couture C., Schneider C. & Delière L. 2019. OSCAR, a national observatory to support the durable deployment of disease-resistant grapevine varieties. *Acta Hortic.* 1248, 21-34. DOI: 10.17660/ActaHortic.2019.1248.4

Gomez C., Brun L., Chauffour D. & De Le Vallée D. 2007. Effect of leaf litter management on scab development in an organic apple orchard. *Agr. Ecosyst. Env.*, 118, 249-255.

Hochereau F., Claeysens N., Alonso-Ugaglia A., Cristerna-Ragasol C., Barbier J.M., Blonde P. & Touzard J.-M. 2015. Quel développement des cépages résistants ? Éléments de réflexion tirés du projet Panoramix (INRA SMaCH 2015). *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques*, 157S, 28-31.

Niks R.E., Qi X. & Marcel T.C. 2015. Quantitative Resistance to Biotrophic Filamentous Plant Pathogens: Concepts, Misconceptions, and Mechanisms. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 53, 445–470.

Marès, M. H. 1857. Manuel pour le soufrage des vignes malades : emploi du soufre, ses effets. 2de édition, J.A. Dumas éditeur, Montpellier, 94 pp.

Merdinoglu D., Schneider C., Prado E., Wiedemann-Merdinoglu S. & Mestre P. 2018. Breeding for durable resistance to downy and powdery mildew in grapevine. *OENO One*, 52, 189-195.

Mestre P., Carrere S., Gouzy J., Piron MC., Tourvieille de Labrouhe D., Vincourt P., Delmotte F. & Godiard L. 2016. Comparative analysis of expressed CRN and RXLR effectors from two *Plasmopara* species causing grapevine and sunflower downy mildew. *Plant Pathol.*, 65, 767–781.

Miclot A.S., Guimier S., Delmotte F., Fabre F., Mazet I., Couture C. & Delière L. 2019. Gestion durable des résistances en viticulture. Détecter l'apparition de contournements, l'émergence de nouvelles problématiques sanitaires et adapter les systèmes de cultures. *Innovations Agronomiques*, 77, 19-30.

Millardet A. 1891. Essai sur l'hybridation de la vigne, ed. G. Masson, Paris, 42 p.

Millardet A. & Gayon N. 1887. Considérations raisonnées sur les divers procédés de traitement du mildiou par les composés cuivreux suivies d'une notice sur le traitement de la maladie de la pomme de terre et de celle de la tomate. *Journal d'agriculture pratique*, Ed. Feret, Bordeaux, 40 p.

Muthmann R. 2007. The use of plant protection products in the European Union. Ed. Eurostat.

OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin). 2013. Résolution OIV-VITI 515.

Pertot I., Caffi T., Rossi V., Mugnai V., Hoffmann C., Grando M.S., Gary C., Lafond D., Duso C., Thiery D., Mazzonia V. & Anfora G. 2017. A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Prot.*, 97, 70-84.

Rouxel M., Mestre P., Comont G., Lehman B.L., Schilder A. & Delmotte F. 2013. Phylogenetic and experimental evidence for host-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete. *New Phytol.*, 197, 251-263.

Rouxel M., Mestre P., Baudoin A., Carisse O., Delière L., Ellis M.A. & Delmotte F. 2014. Geographic distribution of cryptic species of *Plasmopara viticola* causing downy mildew on wild and cultivated grape in eastern North America. *Phytopathology*, 104, 692-701.

Schneider C. 2006. Place des hybrides dans la viticulture mondiale. *Revue des Œnologues*, 121, 44-47.

Schneider C., Onimus C., Prado E., Dumas V., Wiedemann-Merdinoglu S., Dorne M.A., Lacombe M.C., Piron M.C., Umar-Faruk A., Duchêne E., Mestre P. & Merdinoglu D. 2019. INRA-ResDur: the French grapevine breeding program for durable resistance to downy and powdery mildew. *Proc. XII International Conference on Grapevine Breeding and Genetics. Acta Hortic.*, 1248, 207-213.

Schultz H.R. & Stoll M. 2010. Some critical issues in environmental physiology of grapevines: future challenges and current limitations. *Australian J. Grape Wine Res.*, 18, 115-122.

Staudt G. & Kassemeyer H.H. 1995. Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. *Vitis*, 34, 225–228.