

Rôle déterminant des stilbènes dans la résistance au mildiou de la vigne

Katia GINDRO, Virginia ALONSO-VILLAVERDE, Francine VOINESCO, Jean-Laurent SPRING et Olivier VIRET,
Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon

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



Sporulation du mildiou sur fleurs de Chasselas avant la floraison.

Introduction

Le mildiou [*Plasmopara viticola* (Berk. et M. A. Curtis, de Bary)] est une des principales maladies de la vigne. Sur les 58 dernières années, dans certaines conditions climatiques, ce pathogène cosmopolite a provoqué en Suisse des dégâts économiques importants presque une année sur deux. Selon les conditions climatiques, la lutte nécessite l'application préventive de huit à dix traitements fongicides. Une manière de réduire le nombre de fongicides est de disposer d'un système d'aide à la

décision basé sur la mesure des paramètres météorologiques (Viret *et al.* 2001). La large majorité des cépages cultivés est très sensible au mildiou. Depuis 1996, ACW sélectionne avec succès des cépages résistants par hybridation traditionnelle avec des géniteurs possédant des caractéristiques de résistance aux maladies fongiques. L'introduction de mécanismes de résistance au mildiou nécessite de recourir au patrimoine génétique d'espèces sauvages américaines de *Vitis* ou même d'autres espèces de la famille des *Vitaceae*, comme *Muscadinia rotundifolia*. Les mécanismes de résistance au sein du

genre *Vitis* sont complexes et impliquent notamment des molécules constitutives (produites de façon permanente) et induites (phytoalexines) agissant comme fongicides. La vigne peut produire diverses réponses aux infections causées par le mildiou, incluant la synthèse de callose dans les stomates (Gindro *et al.* 2003), l'induction de peroxydases (Kortekamp et Zyprian 2003), ainsi que des mécanismes impliqués dans les processus de lignification. Toutefois, la production de phytoalexines stilbéniques est une des réponses majeures aux infections fongiques de la vigne (Langcake 1981; Pezet *et al.* 2003; Gindro *et al.* 2006). Différents stilbènes synthétisés à la suite de stress biotiques ou abiotiques ont été caractérisés, tels que l' ϵ et la δ -viniférine, ou encore le pterostilbène. Jusqu'à présent, les études se sont focalisées soit sur la production quantitative des stilbènes, soit sur des observations microscopiques des processus d'infection après inoculation avec *P. viticola*. Toutefois, aucun résultat n'a été publié sur l'effet des stilbènes sur les cellules de la plante et sur celles du mildiou, durant le processus d'infection.

Le but de ce travail est d'identifier le lien existant entre le processus d'infection au niveau cellulaire et l'accumulation des molécules stilbéniques, sur la plante hôte comme sur le pathogène, en travaillant sur trois génotypes de vigne et sur la Muscadine (*Muscadinia rotundifolia*), considérée comme immune au mildiou.

Matériel et méthodes

Matériel biologique et conditions de culture

Des plants greffés de deux cépages de *Vitis vinifera* L, soit le Chasselas sensible (ancien cépage) et le Solaris résistant [Merzling x (Saperavi severneyi x Muscat ottonel)], ainsi que le clone numéro 2091 (Gamaret x Bronner), obtenu par Agroscope ACW, et *Muscadinia rotundifolia* cv. Carlos (amicalement fourni par l'INRA de Montpellier, F) ont été cultivés en serre selon les indications de Gindro *et al.* (2003). Le mildiou utilisé pour les inoculations a été prélevé dans une parcelle de vigne non traitée à Perroy (VD). Les sporanges ont été aspirés à la surface des feuilles infectées et stockés dans des cryo-tubes à -80°C jusqu'à l'utilisation (Gindro et Pezet 2001). Le mildiou a été régulièrement multiplié en case climatisée (photopériode de 16 h de jour (22°C), 8 h d'obscurité (18°C) et 60 % d'humidité relative) sur des boutures de Chasselas.

Microscopie

Des feuilles détachées ont été infectées à l'aide de gouttes d'une suspension contenant 2×10^4 sporanges/ml selon la méthode décrite par Gindro *et al.* (2003).

Résumé

Des feuilles de différents cépages de vigne (*Vitis vinifera* L.), sensibles (Chasselas) ou résistants au mildiou (Solaris et 2091), ainsi que d'une espèce immune (*Muscadinia rotundifolia*) ont été infectées avec du mildiou (*Plasmopara viticola*). Les échantillons ont été analysés par différentes méthodes microscopiques et évalués quant à leur capacité à synthétiser des composés toxiques pour le mildiou (phytoalexines stilbéniques), spécifiquement aux sites des infections. Sur le Chasselas, les résultats ont montré que le mildiou produit des structures d'infections fonctionnelles (haustoria) et peut achever son cycle de développement. En effet, ce cépage sensible ne synthétise que de la picéide, molécule non toxique pour le mildiou. Par contre, le cycle de développement est interrompu sur les cépages résistants. Sur Solaris et 2091, l'arrêt du développement du mildiou intervient après la formation d'haustoria, et est corrélé à la forte production respectivement de δ -viniférine et de pterostilbène localisée sous les gouttes d'infection. Chez la Muscadine, le mildiou est bloqué déjà au moment de la pénétration (pas de formations d'haustoria fonctionnels). La production de stilbènes se fait exactement sur les sites d'infection, à des concentrations au moins vingt fois supérieures à celles des cépages décrits précédemment. Le rôle essentiel des stilbènes dans la résistance au mildiou de *Vitis* spp. est discuté.

A 24 et 72 heures après infection (hpi), des échantillons ont été prélevés sous la zone des gouttes. Ces échantillons ont été observés soit par microscopie optique équipée d'une caméra digitale, soit par microscopie électronique à transmission (MET) sur des coupes ultrafines (épaisseur $0,08 \mu\text{m}$). Des observations ont été réalisées sur du matériel végétal non infecté qui servait de témoin.

Le développement de *P. viticola* a été suivi au microscope à fluorescence selon la méthode de Díez-Navajas *et al.* (2007). Des sections correspondant à la surface des gouttes d'infection ont été placées durant une minute dans une solution aqueuse de bleu d'aniline (0,2 % dans 5 % de NaHCO_3) et observées au moyen d'un microscope à épifluorescence Leica (filtre Leitz A (UV), excitation 340 nm, émission 380 nm, stop filtre LP 430 nm).

Analyse des stilbènes

A différents temps après l'inoculation, des échantillons de feuilles correspondant à la surface des gouttelettes de suspension ou aux zones nécrotiques en développement ont été prélevés à l'aide d'un scalpel à raison de trois répétitions par feuille (trois feuilles par cépage analysé). Les fragments de feuilles ont été pesés et placés dans des tubes de 1,5 ml contenant 50 μ l de méthanol. Les tubes ont ensuite été agités à 60 °C durant 10 min et refroidis 5 min dans la glace. Les stilbènes (picéide, resvératrol, ϵ et δ -viniférine, pterostilbène) ont été analysés par chromatographie (HPLC) (Pezet *et al.* 2003). Les résultats sont exprimés en μ mol/mg de poids frais (PF). Des échantillons témoin ont été traités de la même manière en l'absence du pathogène.

Résultats et discussion

Dans cette étude, le développement du mildiou a été suivi sur les feuilles des quatre cépages étudiés au niveau ultrastructural et analytique (accumulation de stilbènes), entre 24 et 72 heures après infection (hpi). Le Chasselas présente les caractéristiques classiques d'un cépage sensible au mildiou, avec la germination des zoospores, la pénétration du tube germinatif à travers les stomates, la formation d'une vésicule sous-stomatique, la production des structures infectieuses proprement dites (haustoria = suçoirs à nutriments) (fig.1) et la colonisation complète du mésophylle foliaire jusqu'à la sporulation (fig.2A-C). Parallèlement à ce développement, le Chasselas produit et accumule rapidement de la picéide en grande quantité (245 μ mol/mg PF), un composé stilbénique non toxique pour le mildiou (fig.3A), quelle que soit la concentration de ce dernier (Pezet *et al.* 2004a). L'intégrité des cellules est maintenue au cours du développement du pathogène, contrairement aux autres cépages observés. En effet, chez Solaris, le développement du mildiou est très vite limité à la région supérieure du mésophylle, avec une très faible production d'haustoria. Le mycélium est rapidement détruit, parallèlement à l'extrusion du contenu cellulaire de la plante aux sites de formation des haustoria (fig.1D), eux-mêmes rapidement détruits. En fluorescence, ce phénomène se traduit par une fluorescence plus intense à l'extrémité des hyphes ayant produit un haustorium (fig.2E). Ceci coïncide avec la synthèse de différents stilbènes, dont la δ et ϵ -viniférine (respectivement 73 et 322 μ mol/mg PF) (fig.3B), dont les concentrations sont respectivement trois et cinq fois plus élevées que l'ED₅₀ (quantité de produit permettant une inhibition de 50% du développement du pathogène) déterminée pour ces mêmes

molécules (Pezet *et al.* 2004a). Ceci pourrait en partie expliquer la déstructuration cellulaire observée, ainsi que l'apparition de plages nécrotiques sur les sites d'infection (fig.2F). Toutefois, le potentiel de synthèse des viniférines chez Solaris peut décroître au cours du temps et il n'est pas rare d'observer des sporulations de mildiou en fin de saison. Avec le clone 2091, une rapide désorganisation des membranes cellulaires et des organelles a lieu chez le champignon comme dans la plante, sans extrusion du contenu cellulaire (fig.1E, 1F).

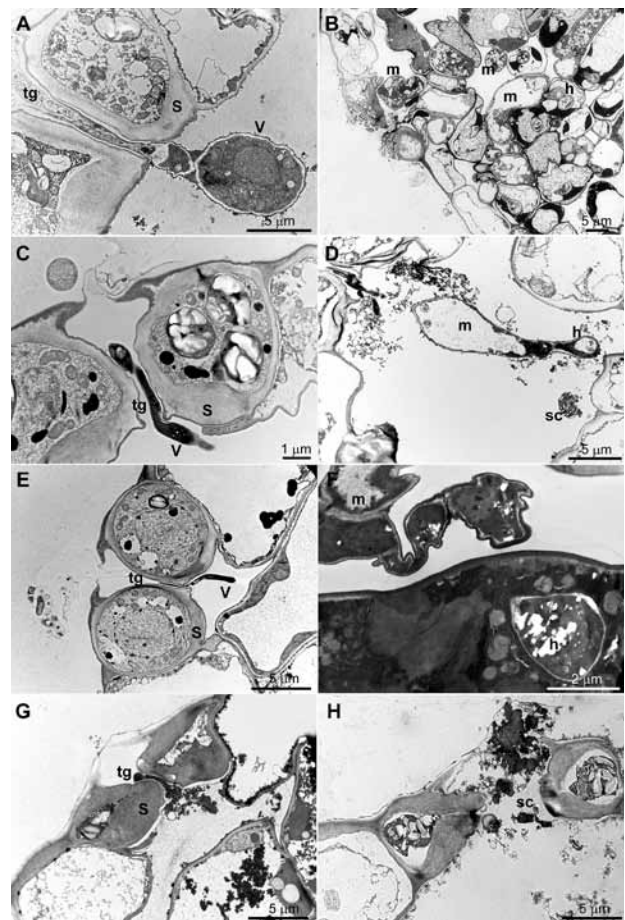


Figure 1 | Développement de *Plasmopara viticola* sur différentes espèces de *Vitaceae*, 24 (A, C, E, G) et 72 (B, D, F, H) heures après infection, observé au microscope électronique à transmission.

A: Chasselas, pénétration du tube germinatif et formation de la vésicule sous-stomatique. B: Chasselas, développement mycélien dans le mésophylle et formation des haustoria. C: Solaris, pénétration du tube germinatif et formation de la vésicule sous-stomatique atypique. D: Solaris, déstructuration du contenu cellulaire de la plante et de l'haustorium. E: 2091, pénétration du tube germinatif et formation de la vésicule sous-stomatique atypique. F: 2091, désorganisation du contenu cellulaire de l'haustorium et de la cellule végétale infectée. G: *Muscadinia rotundifolia*, pénétration du tube de germination sans formation de vésicule. H: *Muscadinia rotundifolia*, destruction totale du contenu cellulaire de la plante et du mildiou et expulsion par le stomate. h: haustorium, m: mycélium de mildiou, s: stomate, sc: sécrétion cellulaire, tg: tube germinatif, v: vésicule sous-stomatique.

Ceci limite le développement du mildiou à la première couche cellulaire du mésophylle et la production d'haustorium à un seul par site d'infection (fig. 2G, 2H). Très rapidement après formation de l'haustorium, ce cépage produit une très forte concentration de pterostilbène. De ce fait, la désorganisation cellulaire peut être due à l'effet très toxique du pterostilbène sur les structures membranaires. En effet, Pezet et Pont (1990) ont pu montrer qu'à faible concentration déjà, le pterostilbène induit la coagulation du contenu cellulaire et la désorganisation des organelles et des membranes en moins de 30 minutes. Dans le cas du cépage 2091 (fig. 3C), cette concentration (118 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ PF) est dix fois supérieure à l' ED_{50} déterminée pour cette même molécule par Pezet *et al.* (2004a), ce qui expliquerait la désorganisation cellulaire observée et l'inhibition totale du développement du mildiou, ainsi que l'apparition rapide de nécroses, quel que soit le stade phénologique de la plante.

Chez la Muscadine, le processus d'infection est stoppé avant même le développement de structures d'infection. Juste après la pénétration du tube germinatif, les structures cellulaires du mildiou et de la plante sont détruites, avec une extrusion rapide du matériel

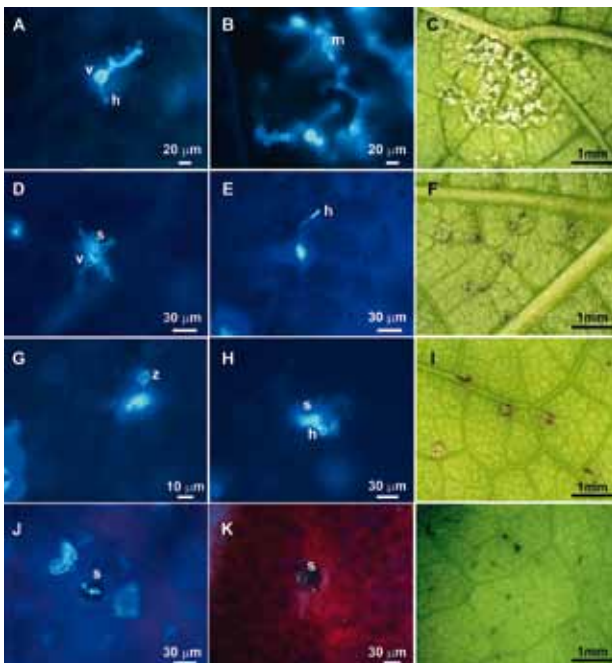


Figure 2 | Développement de *Plasmopara viticola* sur différentes espèces de *Vitaceae*, 24 et 72 heures après infection (hpi) au microscope à fluorescence et à la loupe binoculaire. A, D, G, J: développement du mildiou 24 hpi respectivement sur Chasselas, Solaris, 2091 et *Muscadinia rotundifolia*. B, E, H, K: développement du mildiou 72 hpi respectivement sur Chasselas, Solaris, 2091 et *M. rotundifolia*. C, F, I, L: aspect des zones d'infection 72 hpi respectivement sur Chasselas, Solaris, 2091 et *M. rotundifolia*. h: haustorium, m: mildiou, s: stomate, v: vésicule sous-stomatique, z: zoospore. La barre d'échelle correspond à 10 μm .

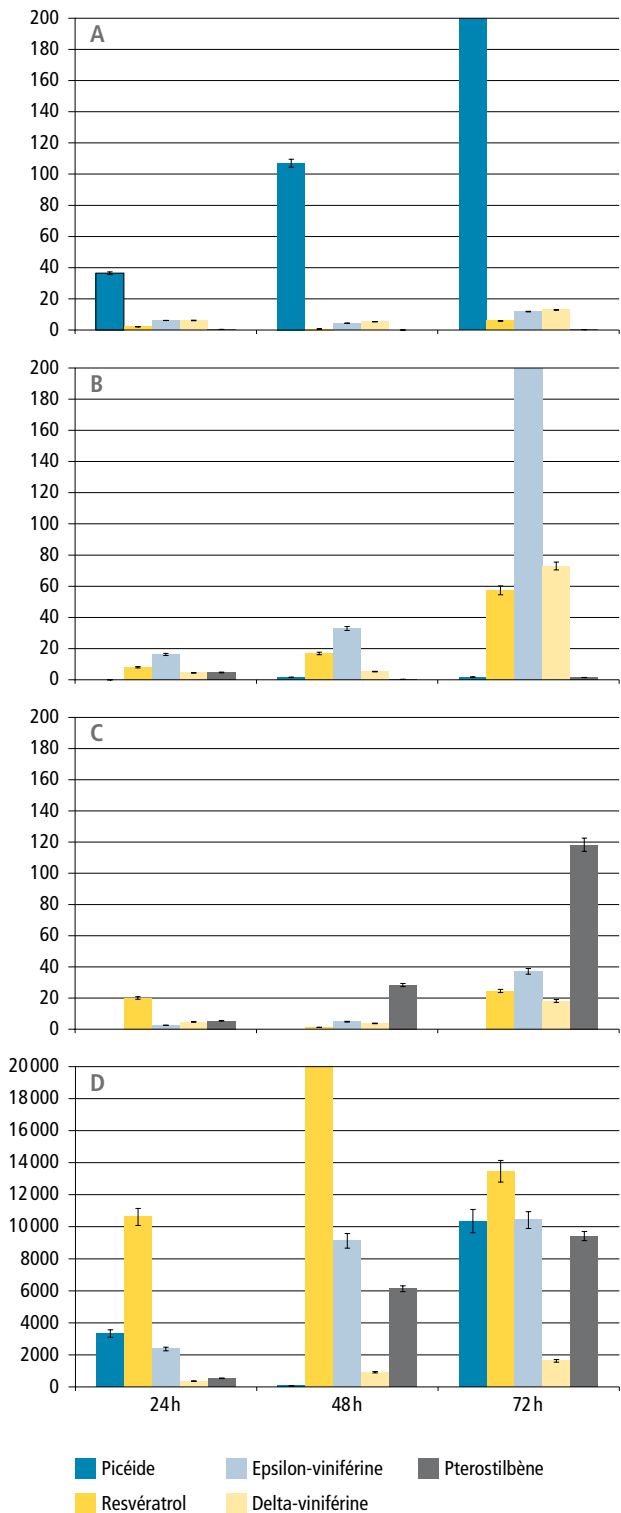


Figure 3 | Quantification des stilbènes 24, 48 et 72 heures après infection par *Plasmopara viticola* de quatre différentes espèces de *Vitaceae*. A: Chasselas. B: Solaris. C: 2091. D: *Muscadinia rotundifolia*. L'axe Y représente la quantité de stilbènes exprimée en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ PF. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de trois répétitions.

cytoplasmique cellulaire au travers des stomates (fig.1H). Comparativement aux trois autres cépages étudiés, *M. rotundifolia* (fig.3D) produit, 72 heures après l'infection, 42 fois plus de picéide que le Chasselas ($1,04 * 10^4 \mu\text{mol/mg PF}$), 32 et 22 fois plus d' ϵ et δ -viniférine que le Solaris (respectivement $1,04 * 10^4$ et $1,6 * 10^3 \mu\text{mol/mg PF}$) et 80 fois plus de pterostilbène que le cépage 2091 ($9,4 * 10^3 \mu\text{mol/mg PF}$). Ce phénomène expliquerait l'apparition de nécroses très ponctuelles aux sites d'infection (fig. 2L). Comme décrit précédemment par Pezet *et al.* (2004b), la δ -viniférine et le pterostilbène sont considérés comme les plus toxiques vis-à-vis du mildiou mais, généralement, le pterostilbène est absent ou en trop faible concentration pour avoir un effet significatif. L'inhibition totale du développement du mildiou observée chez la Muscadine peut être précisément due à la production immédiate de très hautes concentrations de stilbènes toxiques, avant même que les structures d'infection se forment. D'autres travaux ont montré que les mécanismes de résistance de la vigne n'étaient déclenchés qu'avec la formation d'haustoria fonctionnels (Díez-Navajas *et al.* 2008). Toutefois, notre travail établit que la synthèse des stilbènes peut débuter avant la formation des structures d'infections. La présence de ce mécanisme chez *M. rotundifolia* pourrait signifier que la formation des haustoria n'est pas l'étape-clé pour l'établissement de la biotrophie, et la reconnaissance de l'hôte.

Conclusions

- Les cépages résistants au mildiou réagissent très rapidement aux infections en produisant des concentrations très élevées de stilbènes toxiques aux sites d'infection.
- Plus le développement du mildiou est stoppé rapidement, plus la réaction est localisée aux sites d'infection. La synthèse des stilbènes se fait rapidement à de très hautes concentrations, empêchant le mildiou d'établir des structures d'infection fonctionnelles.
- La production de stilbènes est un des mécanismes de défense les plus efficaces contre le mildiou. Les cépages résistants ne les synthétisent pas tous de la même façon ni dans les mêmes quantités.
- La synthèse massive de pterostilbène semble déterminante pour maintenir le niveau de résistance des cépages au mildiou dans le temps.
- La formation d'haustoria fonctionnels n'est pas l'étape-clé de l'induction des mécanismes de résistance au mildiou chez la vigne.
- L'utilisation du patrimoine génétique de *Muscadinia rotundifolia* dans le programme de sélection de cépages résistants aux maladies fongiques d'ACW, en collaboration avec l'INRA de Colmar, est une piste à poursuivre afin d'augmenter le niveau de résistance des nouvelles obtentions. ■

Remerciements

Nous tenons à remercier Eric Remolif et Sevan Kuyumcuyan pour toute l'aide apportée durant ces expérimentations, ainsi que la fondation *Juana de Vega* (Espagne) pour son soutien financier.

Bibliographie

- Díez-Navajas A. M., Wiedemann-Merdinoglu S., Greif C. & Merdinoglu D., 2008. Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology* **98**, 776–780.
- Díez-Navajas A. M., Greif C., Poutaraud A. & Merdinoglu D., 2007. Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycete *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues. *Micron* **38**, 680–683.
- Gindro K., Pezet R. & Viret O., 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 846–853.
- Gindro K., Spring J.L., Pezet R., Richter H. & Viret O., 2006. Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. *Vitis* **45**, 191–196.
- Gindro K. & Pezet R., 2001. Effects of long-term storage at different temperatures on conidia of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 101–104.
- Kortekamp A. & Zyprian E., 2003. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. *J. Plant Physiol.* **160**, 1393–1400.
- Langcake P., 1981. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, δ -viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* **18**, 213–226.
- Pezet R., Perret C., Jean-Denis J. B., Tabacchi R., Gindro K. & Viret O., 2003. δ -viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 5488–5492.
- Pezet R., Gindro K., Viret O. & Richter H., 2004a. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* **43**, 145–148.
- Pezet R., Gindro K., Viret O. & Spring J.-L., 2004b. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **65**, 297–303.
- Pezet R. & Pont V., 1990. Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* **129**, 19–30.
- Viret O., Bloesch B., Tailens J., Siegfried W. & Dupuis D., 2001. Prévision et gestion des infections du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) à l'aide d'une station d'avertissement. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **33** (2), 1–XII.

Summary**Effectiveness of stilbenes in resistant *Vitaceae***

Leaves of different *Vitis vinifera* L. cultivars, susceptible (Chasselas) or resistant to downy mildew (Solaris and 2091), as well as the immune *Muscadinia rotundifolia* were inoculated with *Plasmopara viticola*. Samples were examined by microscopy for their ability to synthesize toxic compounds towards downy mildew at infection sites (stilbenic phytoalexins). In the susceptible Chasselas, *P. viticola* completes its life cycle with the production of functional haustoria as the cultivar produces mainly the non toxic piceide. The development of downy mildew is different in each of the other three resistant grape cultivars. In Solaris and 2091, the development is stopped after the formation of haustoria and is correlated to the synthesis of respectively δ -viniferin and pterostilbene. In *M. rotundifolia*, downy mildew development stops immediately after germ tube penetration (without functional haustoria formation). Stilbenes are here produced exactly at the infection sites. Their concentration is at least 20 times higher than in the three other cultivars. The relevant role of stilbenes in mildew resistance of *Vitis* spp. is discussed.

Key words: downy mildew, epifluorescence microscopy, grapevine, leaf, stilbenes, stomata, resistance, ultrastructure.

Zusammenfassung**Rolle der Stilbene in Mehltau-resistenten Rebsorten**

Blätter verschiedener mehlttauresistenter Rebsorten (Solaris und die neue Züchtung von ACW, Nummer 2091), verglichen mit der anfällige Sorte Chasselas und der immune Sorte *Muscadina rotundifolia* wurden mit Mehltau (*Plasmopara viticola*) infiziert. Die Proben wurden mittels verschiedener mikroskopischer Verfahren untersucht, um die biochemischen natürlichen Abwehrmechanismen gegen Mehltau (Stilbenphytoalexine) an der Infektionsstelle zu untersuchen. Auf der empfindlichen Sorte Chasselas vollendet der Mehltau seinen Entwicklungszyklus, indem Piceid (ein nicht toxisches Molekül) aus Resveratrol synthetisiert wird und funktionelle Infektionsstrukturen wie Haustorien gebildet werden. Auf den resistenten Rebsorten wird der Mehltauzyklus unterbrochen. Bei den Sorten Solaris und 2091 wird die Entwicklung des Mehltaus, in Verbindung mit der starken Produktion von δ -Viniferin und Pterostilbene, nach der Ausbildung von Haustorien unterbrochen. Bei *Muscadinia* wird der Mehltau bereits beim Eindringen gehemmt ohne Ausbildung von funktionellen Haustorien. Die Produktion von Stilbenen ist an der Infektionsstelle lokalisiert und mindestens 20 Mal konzentrierter als bei den anderen Rebsorten. Die wesentliche Rolle der Stilbene bei der Resistenz von *Vitis* spp. wird diskutiert.

Riassunto**Ruolo determinante degli stilbeni nella resistenza della vite a *Plasmopara viticola***

Foglie di diversi vitigni (*Vitis vinifera*) sensibili (Chasselas), oppure resistenti alla peronospora (Solaris e 2091) e la varietà immune *Muscadinia rotundifolia* sono state infettate con la peronospora (*Plasmopara viticola*). I campioni sono stati sottoposti a vari metodi di analisi microscopica per valutarne la capacità di sintetizzare composti tossici per la peronospora (fitolessine stilbeniche), in modo specifico sui siti dell'infezione. I risultati hanno evidenziato che la peronospora può portare a termine il proprio ciclo di sviluppo sul Chasselas inducendo la produzione di piceide, una molecola non tossica per il fungo, e producendo strutture d'infezioni funzionali (haustoria). Sui vitigni resistenti il ciclo è invece interrotto. Sulle varietà Solaris e 2091, l'interruzione dello sviluppo della peronospora avviene dopo la formazione di haustoria ed è correlata con la forte produzione di δ -viniferina, rispettivamente di pterostilbene sotto le gocce d'infezione. Nella *Muscadinia*, la peronospora è bloccata già al momento della penetrazione (nessuna formazione di haustoria funzionali). La produzione di stilbeni avviene esattamente sui siti dell'infezione, con concentrazioni almeno venti volte superiori a quelle degli vitigni precedentemente descritti. Il ruolo svolto dagli stilbeni per la resistenza alla peronospora da *Vitis* spp. è discusso.