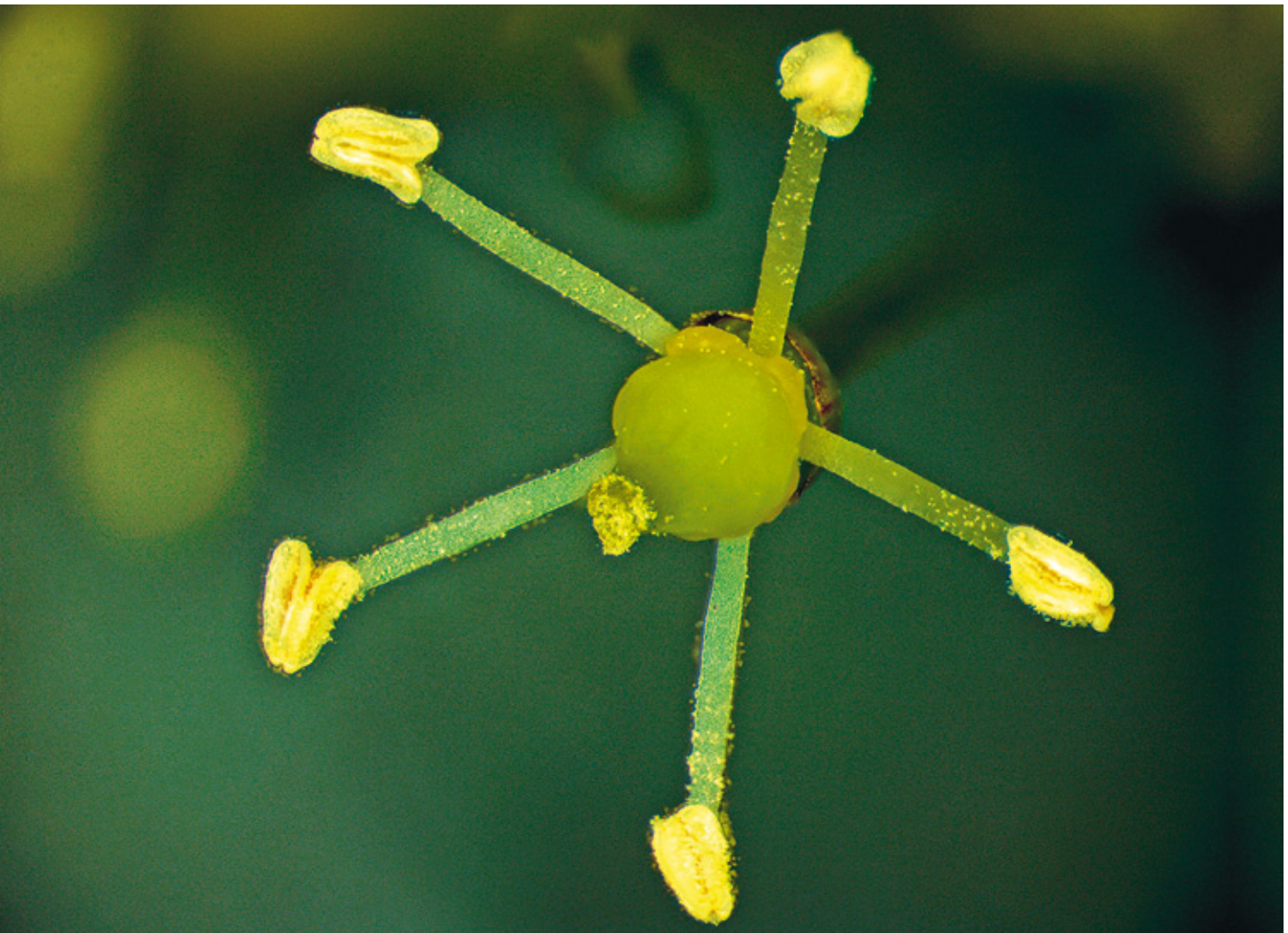


# Un outil moléculaire pour détecter précocement le mildiou, l'oïdium et la pourriture grise dans les tissus de la vigne

Katia GINDRO, Nicole LECOULTRE, Jean-Pierre DE JOFFREY, Sylvain SCHNEE, Francine VOINESCO, Olivier VIRET et Pierre-Henri DUBUIS, Agroscope, Institut des sciences en production végétale (IPV), 1260 Nyon, Suisse  
Renseignements: Katia Gindro, e-mail: [katia.gindro@agroscope.admin.ch](mailto:katia.gindro@agroscope.admin.ch), tél. +41 58 460 43 74, [www.agroscope.ch](http://www.agroscope.ch)



Fleur asymptotique de *Vitis vinifera* cv. Chasselas.

## Introduction

Les relations complexes entre organismes, comme celles des micro-organismes et de leurs substrats, peuvent être étudiées en utilisant des procédés indépendants des techniques classiques de culture. Parmi eux, la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Van Belkum *et al.* 1998;

Sachse 2004), la *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Vanechoutte 1996), le pyroséquençage (Petrosino *et al.* 2009) et, plus récemment, la métagénomique (Miller *et al.* 2013; Ross-Davis *et al.* 2013), la metatranscriptomique (McGrath *et al.* 2010) et autres *meta'omics* (Lepage *et al.* 2013) offrent de nouvelles voies pour l'étude d'écosystèmes complexes et de leurs

interactions (Segata *et al.* 2013). Le développement de ces méthodes a permis de détecter des organismes spécifiques au sein de matrices complexes.

La PCR trouve aujourd'hui de nombreuses applications en biologie, en écologie et en médecine. Cependant, dans la plupart des cas, elle exige au préalable une purification des acides nucléiques. Une méthode de PCR directe, sans purification de l'ADN, a été développée précédemment par Agroscope pour détecter la forme latente de *Botrytis cinerea* dans des jeunes baies de vigne (Gindro *et al.* 2005). Combinée à des observations microscopiques (Keller *et al.* 2003), elle a permis d'étudier l'épidémiologie de ce champignon de l'infection au stade de la floraison en suivant toute la période de latence jusqu'à l'expression de la maladie. Les nouvelles connaissances sur l'épidémiologie de la pourriture grise fournies par ces données ont confirmé l'importance de protéger la vigne contre les infections de *Botrytis cinerea* durant la floraison.

Parmi la dizaine d'espèces considérées comme les principaux pathogènes fongiques de la vigne, la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), le mildiou (*Plasmopara viticola*) et l'oïdium (*Erysiphe necator*) ont la plupart des dégâts à leur actif.

Leur nature de biotrophe obligatoire ne permet pas de cultiver *P. viticola* et *E. necator* sur des milieux de croissance artificiels, rendant ainsi leur étude plus compliquée et chronophage. La méthode classique par PCR a été décrite pour l'identification ou la quantification de *B. cinerea* dans des échantillons d'air (Carisse *et al.* 2009), d'*E. necator* dans les raisins, les moûts et le vin (Stummer *et al.* 2006) et dans l'air (Thiessen *et al.* 2013) et de *P. viticola* dans des feuilles de vigne (Valesia *et al.* 2005). Des réactions de PCR sans purification d'ADN ont par ailleurs été développées dans certains cas, en comptant sur la lyse des cellules aux températures élevées d'amplification. Ces techniques ont été appliquées à des cellules bactériennes (Gussow et Clackson 1989), des feuilles de tabac et des morceaux de racines (Berthomieu et Meyer 1991), des spores de champignons (Aufavre-Brown *et al.* 1993) et dans des diagnostics sur tissus animaux pour détecter la présence de bactéries et virus (Olive 1989). Les réactions d'amplification sont parfois inhibées par un nombre trop élevé de cellules, des fragments de paroi cellulaire, des protéines liées à l'ADN, des polysaccharides, des phénols, des détergents ou une lyse cellulaire insuffisante (Moreira 1998; Dewey et Yohalem 2004). Les tissus végétaux sont très riches en polysaccharides et polyphénols, dont des métabolites secondaires comme les phytoalexines et la lignine (Taiz et Zeiger, 2010) peuvent inhiber les réactions de PCR, ce qui rend le processus de

**Résumé** ■ Une méthode simple et fiable a été mise au point pour détecter des propagules fongiques dans les tissus de la vigne par amplification directe par PCR, sans purifier préalablement l'ADN. Le potentiel de cette méthode est illustré par quelques exemples. Pour cela, différents échantillons de vigne ont été broyés en présence de polyvinylpyrrolidone et utilisés directement comme matrice pour l'amplification par PCR avec des amorces spécifiques pour la vigne et ses trois principaux pathogènes fongiques, *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* et *Botrytis cinerea*. La spécificité des amplifications a été validée par séquençage des produits de PCR. Des séries de dilution des différentes propagules fongiques étudiées ont montré la grande sensibilité des réactions pour *P. viticola*, *B. cinerea* et *E. necator*, soit un sporange ou une seule conidie chaque fois. La microscopie permet de visualiser les spores et autres propagules fongiques dans les tissus végétaux, notamment les bourgeons dormants ou les fleurs de la vigne, sans toutefois pouvoir identifier les espèces présentes, ce qui a été réalisé en parallèle par PCR directe. L'oïdium et la pourriture grise ont été détectés respectivement dans 29 et 65 % des bourgeons analysés. Le mildiou a été recherché dans les feuilles juste après des épisodes de pluie ou de rosée potentiellement infectieux. La pourriture grise a été trouvée dans des fleurs asymptomatiques après visualisation par microscopie et identification par PCR directe. Des observations microscopiques de rafles asymptomatiques ont décelé la présence d'hyphes, que la PCR directe a attribuées à *P. viticola*. La validation et l'utilisation de cette méthode sont discutées comme complément à la microscopie, notamment pour l'étude de l'épidémiologie de champignons biotrophes.

purification des acides nucléiques habituellement indispensable.

Cet article décrit une méthode de PCR directe pour détecter l'ADN de champignons présents dans différents tissus végétaux sans purification d'ADN. Le potentiel de cette technique est illustré à travers trois questions épidémiologiques: *E. necator* et *B. cinerea* sont-ils présents dans les bourgeons dormants? Peut-on mettre en évidence des infections de mildiou juste après des épisodes potentiellement infectieux? Est-il possible de détecter le mildiou dans des rafles asymptomatiques et de suivre sa progression? Ou de mettre en évidence *Botrytis* dans des fleurs asymptomatiques et de le suivre durant le développement de la grappe? ➤

## Matériel et méthodes

### Matériel biologique et conditions de culture

Les parcelles expérimentales d'Agroscope à Changins, plantées en 2005 avec du Chasselas greffé sur 3309, ont été utilisées pour toutes les expérimentations effectuées en 2013 et 2014, sur feuilles, inflorescences, grappes et bourgeons. Ces derniers ont été récoltés en février 2013 et 2014 sur des plantes non traitées fortement infectées l'année précédente par l'oïdium.

***Plasmopara viticola***: les feuilles et les grappes de trois plantes ont été infectées artificiellement avec une suspension aqueuse de sporanges au stade BBCH 57 (inflorescences pleinement développées) (Hack *et al.* 1992) comme décrit par Gindro *et al.* (2003). Pour détecter précocement les infections de *Plasmopara viticola* sur *V. vinifera* cv. Cabernet franc, des feuilles entières ont été récoltées de façon aléatoire dans un vignoble de Bordeaux le jour suivant des épisodes potentiellement infectieux (pluie ou rosée) et directement congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

***Botrytis cinerea***: des inflorescences ont été artificiellement infectées au stade pleine fleur (stade BBCH 65) avec une suspension aqueuse de conidies selon Viret *et al.* (2004) sur trois plantes.

***Erysiphe necator***: des conidies ont été récoltées de feuilles infectées tel que décrit précédemment par Schnee *et al.* (2008).

### Préparation des échantillons et amplification par PCR

Les échantillons végétaux, feuilles (3 mg), fleurs (40 mg), sections de rafle (40 mg) et bourgeons (20 mg), ont été broyés au pilon en plastique en tube Eppendorf dans  $100\ \mu\text{l}$  d'eau contenant 1 % (p/v) de polyvinylpyrrolidone (PVPP), sauf les bourgeons, broyés dans  $500\ \mu\text{l}$  d'eau. Cet extrait brut a été dilué 10 et 100 fois avec de l'eau nanopure et utilisé directement pour les amplifications par PCR.

Par ailleurs, des échantillons plus grands, tels que des feuilles de vigne entières prélevées au champ, ont été

placés dans des sachets ELISA, congelés dans de l'azote liquide et réduits à l'homogénéisateur (Homex 6, Bioreba AG) en poudre fine stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation. Cette poudre a ensuite été suspendue dans 2 ml de tampon PBS 1 x contenant 0,05 % (v/v) Tween 20 et 2 % (p/v) PVPP. Des aliquotes de cette solution ont été dilués 10 et 100 fois, puis utilisés directement pour l'amplification par PCR. Les réactions de PCR ont été faites dans un volume final de  $25\ \mu\text{l}$  contenant 2U TAQ (Taq DNA polymérase, Qiagen), 1 x tampon PCR,  $0,4\ \mu\text{M}$  de chaque amorce (tabl. 1),  $0,2\ \text{mM}$  de chaque DNTP,  $3\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  et  $18,3\ \text{ml}$  de l'extrait dilué, dans un appareil Biometra T3000 comprenant une première étape de cassage à  $97^{\circ}\text{C}$  durant quinze minutes permettant de lyser les cellules, suivie de 35 cycles à  $94^{\circ}\text{C}$  30s,  $54^{\circ}\text{C}$  trente secondes,  $72^{\circ}\text{C}$  nonante secondes et une étape finale d'extension à  $72^{\circ}\text{C}$  dix minutes. Les amplifications de contrôle ont été effectuées comme l'ont décrit Gindro *et al.* (2005), en utilisant des séries de dilution de spores afin de vérifier la sensibilité de la réaction de PCR (1000, 100, 10, 1 spore/ $\mu\text{l}$ ). Le nombre de spores a été compté au microscope sur des lames standardisées avant les dilutions et les réactions de PCR ajustées à 1000 spores/ $\mu\text{l}$ . Les produits de PCR ont été purifiés et séquencés pour confirmer la spécificité de la réaction PCR.

### Microscopie électronique

Chaque échantillon, soit des fragments de feuille, de rafle, de bourgeons dormants et de fleurs, a été préparé selon la méthode de Roland et Vian (1991), préfixé avec une solution de glutaraldéhyde 3 % / paraformaldéhyde 2 % dans du tampon phosphate  $0,07\ \text{M}$  à pH 7, enrobé dans de l'agarose 2 % et post-fixé dans une solution d' $\text{OsO}_4$  1 %. Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans des solutions d'éthanol à concentration croissante (30-50-70-95-100 % (v/v)) et enrobés dans la résine LR White. Après polymérisation (vingt-quatre heures à  $60^{\circ}\text{C}$ ), des coupes semi-fines ( $0,8\ \mu\text{m}$ ) et ultra-fines ( $0,08\ \mu\text{m}$ ) ont été préparées puis colorées avec une solution de bleu de méthylène 1 % / tétraborate de

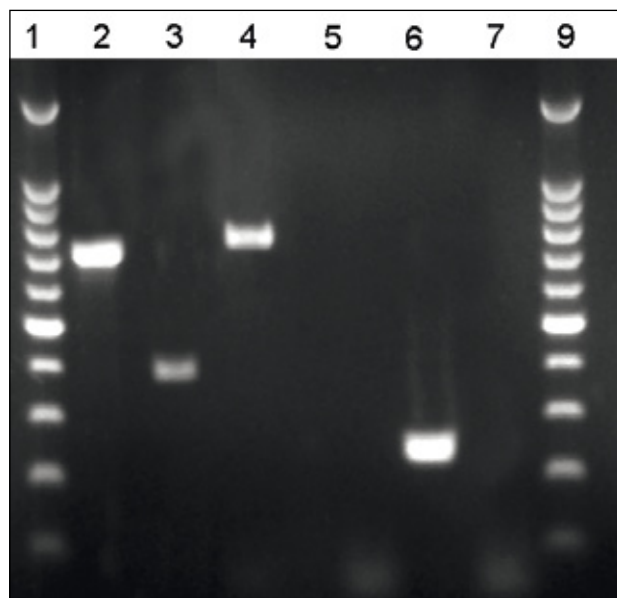
Tableau 1 | Séquences des différentes amorces utilisées dans cette étude

Organisme	Nom de l'amorce	Séquence	Taille du fragment (pb)
<i>Plasmopara viticola</i>	LSU 1+_PV	TAGTAACGCGAGTGAAGCG	698
	LSU 2-_PV	GTTACGACTCGCATCAATCCA	
<i>Erysiphe necator</i>	Uc592+	AGTAAAAGATGTCAACGCCGAAGA	379
	Uc946-	AGCGCAAAAAGATGAGTCAAAATTC	
<i>Botrytis cinerea</i>	C729+	AGCTCGAGAGAGATCTCTGA	730
	C729-	CTGCAATGTTCTGCGTGGA	
<i>Vitis vinifera</i>	Vvin-F	CCTTCAGGTGGGTACAGTGG	241
	Vvin-R	CATTCCCAACTGCATCAGTCAC	

sodium et azure II pour les coupes semi-fines, ou avec une solution d'acétate d'uranyl suivi de citrate de plomb selon Reynolds (1963) pour les coupes ultrafines. Les coupes semi-fines ont été observées au microscope optique équipé d'une caméra (Leica DFC 490 FX). Les coupes ultrafines ont été observées au microscope électronique à transmission (Philips CM10) équipé d'une caméra Mega View II.

## Résultats et discussion

La PCR directe s'avère une méthode simple, fiable et rapide pour détecter un micro-organisme dans des tissus végétaux asymptomatiques. La figure 1 présente un gel d'agarose permettant de visualiser les trois principaux pathogènes fongiques dans les tissus asymptomatiques de la vigne. Les diverses bandes, de tailles différentes, ont été purifiées du gel et séquencées afin de confirmer l'identité des produits de PCR. Les tissus verts et lignifiés de la vigne contiennent beaucoup de composés phénoliques et polyphénoliques, tels que les stilbènes, les anthocyanes, les flavonoïdes, mais aussi des sucres tous potentiellement inhibiteurs des réac-



**Figure 1** | Amplification par PCR directe sur des feuilles de *Vitis vinifera* cv. Chasselas infectées par *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, de fleurs infectées par *Botrytis cinerea* et de feuilles de *Vitis vinifera* cv. Chasselas témoin non infectées.

Piste 1 et 14: échelle d'ADN 1kb. Piste 2: détection de *P. viticola* sur des tissus végétaux infectés. Piste 3: détection d'*E. necator* sur des tissus végétaux infectés. Piste 4: détection de *B. cinerea* sur des tissus végétaux infectés. Piste 5: détection de *B. cinerea* sur des tissus végétaux sains. Piste 6: détection de *V. vinifera* sur des tissus végétaux sains. Piste 7: contrôle négatif avec de l'eau. Taille des fragments obtenus: *P. viticola* 698 pb, *E. necator* 379 pb, *B. cinerea* 730 pb et *V. vinifera* 241 pb.

tions de PCR. Dans des réactions de PCR directe, où aucune étape de purification n'est utilisée, ces inhibiteurs sont présents dans les mélanges réactionnels. De ce fait, sur les tissus verts de la vigne, un chélateur des composés phénoliques et polyphénoliques, le PVPP, est ajouté avant le broyage des tissus et la lyse des cellules. De même, l'extrait brut est dilué 10 à 100 fois pour permettre en parallèle la dilution d'autres inhibiteurs potentiels tels que les sucres. Avec ces moyens assez grossiers de purification, il est essentiel de disposer à chaque fois d'un contrôle positif afin de s'assurer que l'absence d'une bande n'est pas due à une inhibition de la réaction PCR. Le contrôle positif consiste à amplifier une séquence de la vigne. La sensibilité de la PCR directe a été testée grâce à des dilutions successives de conidies et sporanges dans l'eau. Le seuil de détection des amorces de *B. cinerea* était d'une conidie/ $\mu$ l, conformément aux résultats obtenus précédemment (Rigotti *et al.* 2002; Gindro *et al.* 2005), d'un sporange/ $\mu$ l pour *P. viticola* et d'une conidie/ $\mu$ l pour *E. necator*.

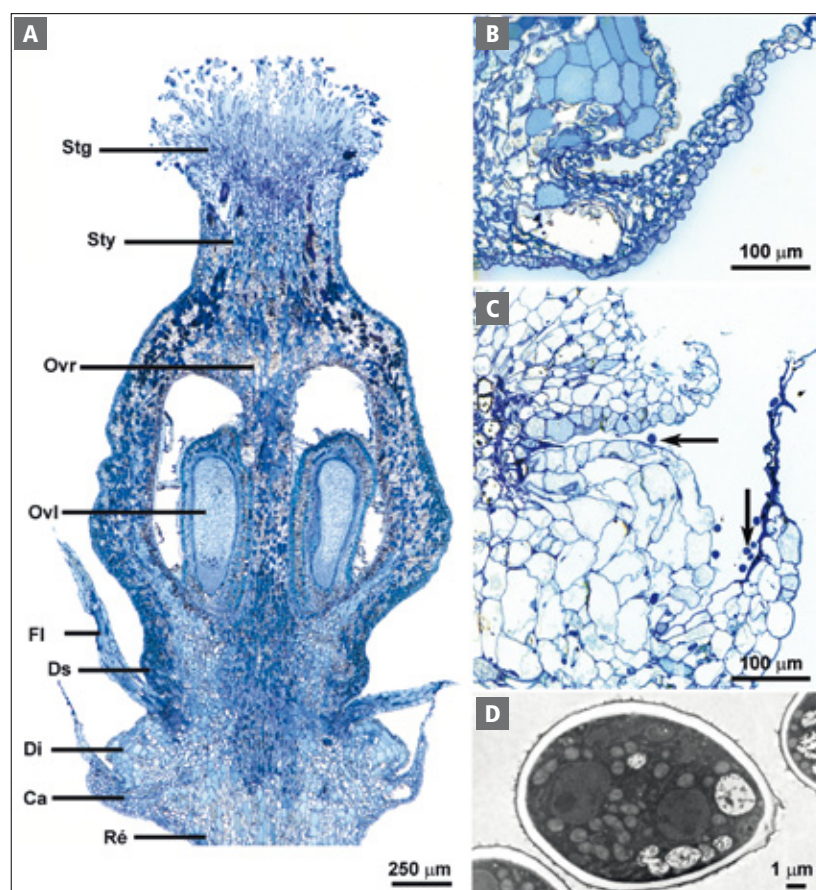
La PCR directe peut être utilisée pour étudier toute sorte de problèmes épidémiologiques, tels que la latence des pathogènes dans des tissus apparemment sains, le mode et le lieu d'hivernation de ces pathogènes comme les bourgeons dormants, en particulier pour des pathogènes biotrophes non cultivables sur milieux artificiels. L'étude au microscope de coupes de tissus végétaux permet de visualiser la présence de structures fongiques, mais sans pouvoir les identifier faute de structures spécifiques à l'espèce.

Plusieurs auteurs considèrent que *B. cinerea* infecte les fleurs et reste latent dans les baies immatures jusqu'à la véraison, à partir de laquelle la pourriture grise peut rapidement détruire des grappes entières, selon les conditions météorologiques (McClellan et Hewitt 1973; Pezet et Pont 1986; Viret *et al.* 2004). Les observations microscopiques effectuées après infection artificielle de grappes de Chasselas au champ (BBCH 65) ont montré que les spores et propagules fongiques se maintiennent dans la région du réceptacle (fig. 2) durant le développement de la grappe, plus précisément dans les sillons situés entre les disques inférieurs et supérieurs du calice. La PCR directe a permis quant à elle de détecter spécifiquement *B. cinerea* durant le développement de la grappe. Cette méthode convient donc parfaitement pour déterminer le potentiel infectieux de la forme latente de botrytis dans les baies et obtenir des données épidémiologiques pour le contrôle de la maladie.

L'infection primaire de l'oïdium peut avoir deux origines. Elle est due soit aux ascospores, spores issues du cycle sexué du champignon, libérées des cléistothèces

présentes sur l'écorce ayant hiverné (Gadoury et Pearson 1986; 1987; Gadoury *et al.* 2012) soit selon les conditions climatiques et le cépage, au mycélium ayant hiverné dans les bourgeons. L'infection démarre alors très tôt dans la saison et se traduit par la formation de pousses en drapeau caractéristiques (Corio-Costet 2007). Pour établir une stratégie de traitement, il est donc important de déterminer si des drapeaux sont présents. En Suisse, les cléistothèces, très nombreuses en fin de saison, sont responsables des infections primaires de l'année suivante, la formation de drapeaux, elle, étant très rarement observée. Il était donc intéressant de savoir si les propagules d'oïdium (spores, fragments mycéliens) sont absentes dans les bourgeons dormants de *V. vinifera* cv. Chasselas dans les conditions suisses ou si des conditions printanières particulières ou d'autres facteurs peuvent inhiber le développement de l'oïdium présent dans les bourgeons dormants. Ces derniers ont donc été récoltés en janvier dans une parcelle de Chasselas non traitée, fortement atteinte de mildiou et d'oïdium l'année précédente. L'examen au microscope a révélé la présence de très nombreuses propagules fongiques (spores, fragments d'hyphes) entre les cataphylles, au sein de la bourre (fig. 3). Des isolements sur milieux nutritifs artificiels

ont mis en évidence toute une communauté fongique non biotrophe, incluant notamment *Botryosphaeria obtusa*, *Eutypa lata*, *Fusarium solani*, *Epicoecum nigrum*. Le microscope permet de distinguer des structures fongiques au sein des bourgeons dormants, mais pas d'identifier les espèces présentes. La PCR directe a ainsi été utilisée pour confirmer la présence spécifique d'*E. necator*, *P. viticola* et *B. cinerea*. Dans les 120 bourgeons analysés, *E. necator* a été repéré par PCR dans 35 bourgeons (29%), *B. cinerea* dans 78 bourgeons (65%) et *P. viticola* n'a pas pu être décelé. *B. cinerea* et *E. necator* ont été détectés ensemble dans 20 bourgeons (17%). Ainsi, même si les drapeaux ne sont pas observés sur Chasselas en Suisse, un tiers des bourgeons issus des parcelles non traitées sont colonisés par *E. necator*. Ces résultats rejoignent ceux de Rumbolz et Gubler (2005) sur *V. vinifera* cv. Carignan en Californie (Etats-Unis), qui indiquent que 32,3% des bourgeons étaient infectés. La présence d'oïdium dans les bourgeons dormants semble sans effet sur l'épidémiologie de ce champignon dans le vignoble suisse. Il serait intéressant d'étudier si *E. necator* se trouve dans les mêmes proportions dans un vignoble traité de façon conventionnelle. La forte incidence de *B. cinerea* a été confirmée par l'isolement classique du champignon sur mi-



**Figure 2** | Coupes semi-fines de fleurs de *Vitis vinifera* cv. Chasselas au stade BBCH 69 infectées ou non par *Botrytis cinerea*.

A. Vue générale d'une coupe fine d'une fleur non infectée.

B. Détail de A: agrandissement de la zone du calice dépourvue de propagules fongiques.

C. Zone des sillons comprise entre les disques inférieurs et supérieurs et présentant de nombreuses propagules fongiques (flèches).

D. Détail de la zone à propagules fongiques de C montrant une spore de champignon.

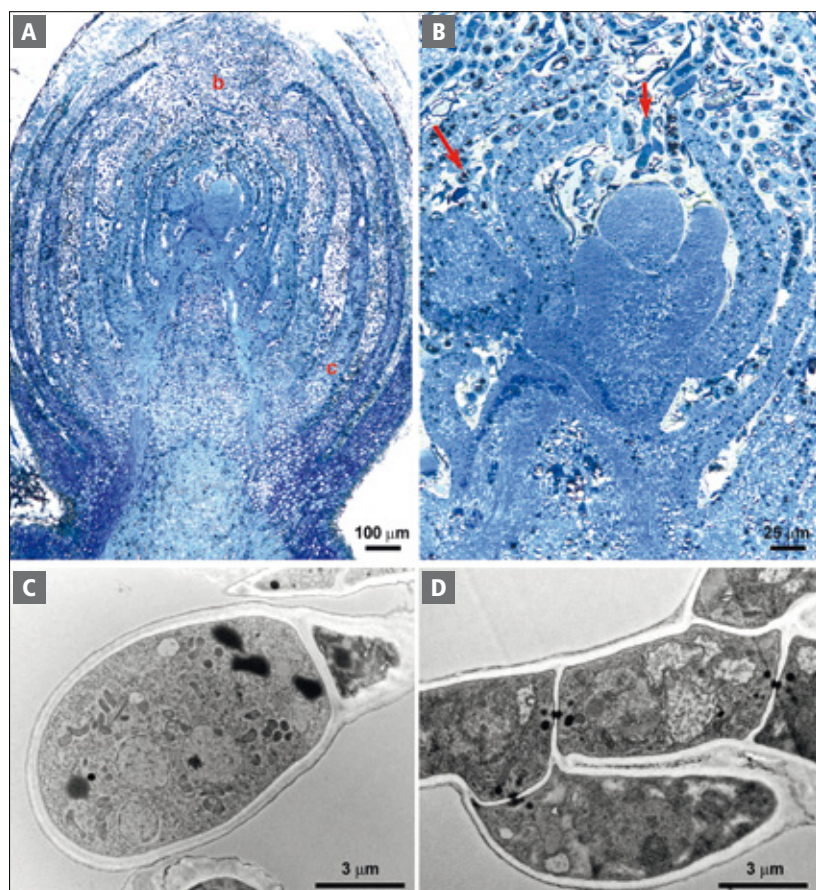
Ca: calice, Di: disque inférieur, Ds: disque supérieur, Fl: filament d'étamine, Ovl: ovule, Ovr: ovaire, Ré: réceptacle, Stg: stigmate, Sty: style.

lieu nutritif gélosé (PDA, *Potato Dextrose Agar*), montrant qu'il pouvait être isolé avec succès de 40 bourgeons sur les 120 analysés (33 %), soit environ la moitié de l'occurrence enregistrée par PCR directe (65 %). Ce résultat montre la sensibilité de cette technique qui, dans certains cas, reconnaît peut-être des propagules ou des conidies non viables. *B. cinerea* est un champignon ubiquiste, il n'est donc pas surprenant de le trouver dans les bourgeons. Même si les très jeunes pampres ne sont pas infectés en conditions naturelles, cette source d'inoculum peut influencer sur des infections plus tardives, comme avec les infections florales et la latence (Keller *et al.* 2003). *P. viticola*, un organisme biotrophe hautement spécialisé, ne parvient pas à coloniser et à survivre dans les bourgeons, conformément aux connaissances actuelles sur l'épidémiologie du mildiou (Gessler *et al.* 2011).

La PCR directe a été utilisée pour détecter de façon précoce le mildiou: les modèles de prévision sont généralement établis pour permettre de traiter à la bonne dose au bon moment (Dubuis *et al.* 2012), mais il est toutefois difficile de prédire l'intensité et la sévérité des épisodes d'infection. En se basant sur la période d'humectation du feuillage et la température, les modèles de prévision permettent d'évaluer de façon précise si les

conditions météorologiques peuvent mener à des infections faibles, modérées ou fortes. Toutefois, la sévérité réelle de l'infection dépend de l'abondance de l'inoculum, assez difficile à évaluer. La PCR directe sur des feuilles entières prélevées au champ de façon aléatoire après des épisodes potentiellement infectieux fournit une première estimation du niveau d'infection de mildiou avant l'apparition des taches d'huile. De tels résultats offriraient aux producteurs le choix d'appliquer un fongicide curatif dans les trois jours suivant l'infection. A titre d'exemple, sur les 41 feuilles de *V. vinifera* cv. Cabernet franc prélevées en juillet après trois jours de forte rosée matinale, huit se sont révélées positives (19,5 %), en accord avec les 15 % de feuilles symptomatiques enregistrés trois semaines plus tard au vignoble.

Une autre utilité sur le plan épidémiologique de la PCR directe concerne le mode d'infection de *P. viticola* menant au rot gris ou brun. Certains travaux ont montré que des fleurs ne pouvaient pas être infectées artificiellement après le stade BBCH 69 en conditions *in vitro*, notamment par manque de stomates fonctionnels sur les éléments floraux dès ce stade (Gindro *et al.* 2012). L'hypothèse discutée ici est que le mildiou pourrait se développer de façon systémique dans les tissus verts à partir de feuilles infectées, vrilles, pédoncules de

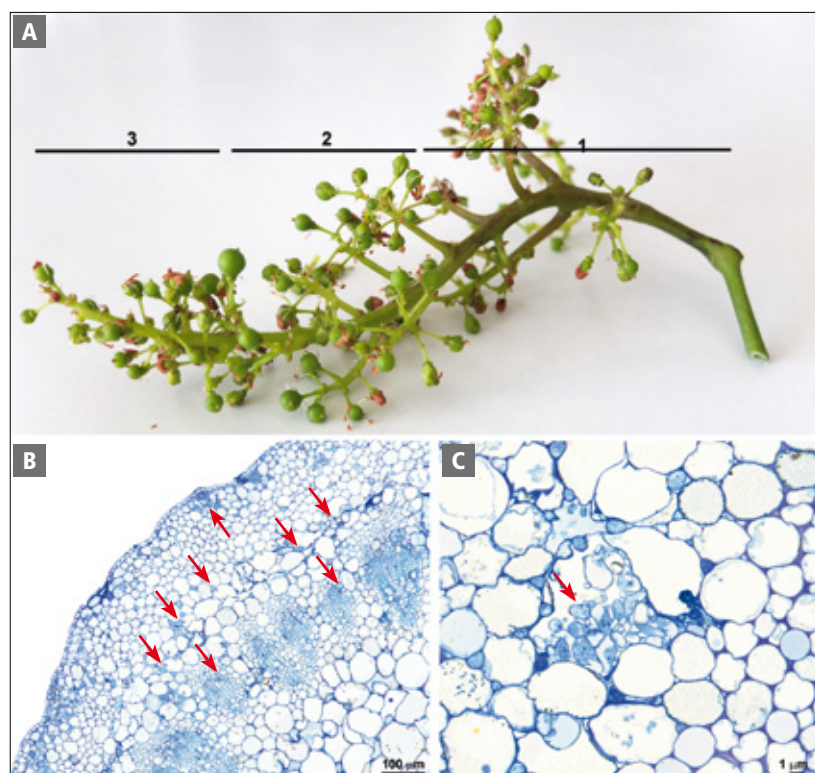


**Figure 3 |** Coupes semi-fines et fines de bourgeons dormants de *Vitis vinifera* cv. Chasselas prélevés au champ. A. Vue générale d'une coupe fine de bourgeon. B. Détail de A: agrandissement de la zone méristématique avec présence de propagules fongiques (flèches). C. Détail de B: propagule fongique type fragment d'hyphe ou microspore au sein de la bourre. D. Détail de B, hyphe en croissance au sein de la bourre. b: bourre, c: cataphylle.

grappe, rachis et pédicelles, comme l'indiquait Gregory (1915). Des observations microscopiques ont été faites le long de la rafle à trois niveaux différents, présentant respectivement des symptômes forts, faibles et nuls. Le pédoncule de la grappe et la partie supérieure de la rafle (fig. 4A, 1) étaient très fortement colonisés par le mildiou, avec de nombreux hyphes et haustoria, tandis que la partie médiane (fig. 4A, 2), peu symptomatique, ne l'était que faiblement, avec peu d'hyphes intercellulaires et d'haustoria, et que *P. viticola* était absent de la zone inférieure de la rafle (fig. 4A, 3) asymptomatique. La PCR directe a, d'une part, confirmé la présence de mildiou dans les deux zones symptomatiques et son absence dans la partie inférieure saine et, d'autre part, validé que les hyphes visibles étaient bien celles du mildiou. Ces observations établissent que *P. viticola* peut croître le long de la rafle au stade BBCH 73 et être détecté par PCR directe. L'hypothèse que *P. viticola* parvient à se développer de façon systémique à travers la rafle pour infecter les baies et mener à la pourriture brune est en cours d'examen.

## Conclusions

- La technique de PCR directe sans purification d'ADN se révèle une méthode simple et fiable pour détecter la présence de pathogènes fongiques dans les tissus verts ou lignifiés de la vigne.
- Elle peut être utilisée pour diverses études en épidémiologie fongique, notamment pour détecter les biotrophes obligatoires dans des échantillons prélevés au champ.
- L'utilisation combinée de la microscopie et de la PCR directe permet à la fois de localiser et d'identifier des organismes présents dans des tissus verts symptomatiques ou asymptomatiques, de même que dans les bourgeons dormants.
- Trois exemples ont permis de démontrer l'utilité d'une telle technique et d'offrir des résultats intéressants en abordant des hypothèses expérimentales:
  - La présence d'*Erysiphe necator* et de *Botrytis cinerea* est attestée dans les bourgeons dormants;
  - Le mildiou peut être détecté dans des feuilles entières peu après des épisodes de pluie ou de rosée. Ces résultats peuvent compléter les systèmes de prévision des risques ([www.agrometeo.ch](http://www.agrometeo.ch));
  - La présence de *Plasmopara viticola* peut être détectée dans le rachis et la progression de la maladie suivie durant la saison. Cette technique est un outil intéressant pour étudier des questions ouvertes telles que la voie d'infection du mildiou causant le rot brun.
- Cette technique, moyennant quelques adaptations, pourrait être étendue à l'étude d'un grand nombre de pathosystèmes différents. ■



**Figure 4 |** Coupes semi-fines d'une grappe de *Vitis vinifera* cv. Chasselas, infectée par *Plasmopara viticola* et prélevée au champ. La rafle présente des zones symptomatique et faiblement symptomatique (1 et 2) et asymptomatique (3).  
 A. Vue générale de la grappe.  
 B. Coupe semi-fine dans la zone 1 avec présence de nombreux hyphes et haustoria (flèches).  
 C. Détail de B avec agrandissement des propagules fongiques (flèche).

### Remerciements

Nous tenons à remercier Eric Remolif pour toute l'aide apportée durant ces expérimentations, de même que MM. Sébastien Vergne et Kees Van Leeuwen (Bordeaux, France) pour leur collaboration et la récolte du matériel végétal utilisé pour les analyses.

### Bibliographie

- Carisse O., Tremblay D. M., Levesque C. A., Gindro K., Ward P. & Houde A., 2009. Development of a TaqMan Real-Time PCR Assay for Quantification of Airborne Conidia of *Botrytis squamosa* and Management of *Botrytis* Leaf Blight of Onion. *Phytopathology* **99**, 1273–1280.
- Corio-Costet M. F., 2007. *Erysiphe necator*. Editions Tec & Doc Lavoisier, 132 p.
- Dubuis P. H., Viret O., Bloesch B., Fabre A. L., Naef A., Bleyer G., Kassemeyer H. H. & Krause R., 2012. Lutte contre le mildiou de la vigne avec le modèle VitiMeteo-Plasmopara. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **44**, 192–198.
- Gadoury D. M., Cadle-Davidson L., Wilcox W. F., Dry I. B., Seem R. C. & Milgroom M. G., 2012. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology* **13**, 1–16.
- Gessler C., Pertot I. & Perazzolli M., 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea* **50**, 3–44.
- Gindro K., Alonso-Villaverde V., Voinesco F., Spring J.-L., Viret O. & Dubuis P.-H., 2012. Susceptibility to downy mildew in grape clusters: New microscopical and biochemical insights. *Plant Physiology and Biochemistry* **52**, 140–146.
- 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 Physiology and Biochemistry* **41**, 846–853.
- Gindro K., Pezet R., Viret O. & Richter H., 2005. Development of a rapid and highly sensitive direct-PCR assay to detect a single conidium of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr in vitro and quiescent forms in planta. *Vitis* **44**, 139–142.
- Keller M., Viret O. & Cole F. M., 2003. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology* **93**, 316–322.
- Rigotti S., Gindro K., Richter H. & Viret O., 2002. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. In strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiology Letters* **209**, 169–174.
- Rossen L., Norskov P., Holmstrom K. & Rasmussen O. F., 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology* **17**, 37–45.
- Schnee S., Viret O. & Gindro K., 2008. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **72**, 128–133.
- Segata N., Boernigen D., Tickle T. L., Morgan X. C., Garrett W. S. & Huttenhower C., 2013. Computational meta'omics for microbial community studies. *Molecular Systems Biology* **9**, 15 p. DOI: 10.1038/msb.2013.22
- Viret O., Keller M., Jaudzems V. G. & Cole F. M., 2004. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: Light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology* **94**, 850–857.

Une liste complète des références est disponible auprès du premier auteur.

## Zusammenfassung

### Ein Werkzeug zur molekularen Früherkennung von echtem und falschem Mehltau und Grauschimmel in Gewebeteilen der Rebe

Ziel dieser Arbeit ist es, eine einfache und zuverlässige Methode zu entwickeln, mit der Reproduktionsformen von Pilzen mittels PCR direkt im Gewebe von Weinreben nachgewiesen werden können, ohne dass dabei die DNA zuerst aufgereinigt werden muss. Das Potential dieser Methode wird anhand einiger Beispiele aufgezeigt. Dazu wurden verschiedene Proben von Weinreben unter Verwendung von Polyvinylpyrrolidon zerkleinert und direkt als Matrix für die Amplifikation durch PCR verwendet, wobei spezifische Primer für die Weinrebe und ihre drei wichtigsten pathogenen Pilze (*Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* und *Botrytis cinerea*) eingesetzt wurden. Durch Sequenzierung der PCR-Produkte wurde nachgewiesen, dass die Amplifikation spezifisch war. Über Verdünnungsreihen von Reproduktionsformen der verschiedenen Pilze konnte mit dem Nachweis von jeweils ein Sporangium bzw. einer einzigen Konidie von *P. viticola*, *B. cinerea* und *E. necator* gezeigt werden,

dass der Test sehr empfindlich ist. Mit Mikroskopie konnten die Sporen und andere Reproduktionsformen der Pilze im Pflanzengewebe, insbesondere in den ruhenden Knospen oder den Blüten der Weinrebe, zwar visuell erfasst, jedoch nicht den Arten zugewiesen werden. Diese Identifikation erfolgte parallel durch direkte PCR. Der Echte Mehltau und die Graufäule wurden in 29 % bzw. 65 % der untersuchten Knospen nachgewiesen. Der Falsche Mehltau wurde im Feld in den Blättern gefunden, unmittelbar nach Regenfällen oder Tau, wenn das Infektionsrisiko gross ist. Die Graufäule wurde in asymptomatischen Blüten durch Mikroskopie visuell beobachtet und durch direkte PCR identifiziert. Bei Beobachtungen mit Mikroskopie konnten Hyphen in asymptomatischen Kämmen nachgewiesen und mit direkter PCR der Art *P. viticola* zugeordnet werden. Es erfolgt eine Diskussion der Validierung und Verwendung dieser Methode im Sinne einer Ergänzung zur Mikroskopie, insbesondere bei der epidemiologischen Untersuchung biotropher Pilze, die sich nicht auf künstlichen Nährmedien kultivieren lassen.





### Summary ■ A molecular tool for the early detection of downy mildew, powdery mildew and grey mold in grapevine tissues

A simple and reliable method is proposed for detecting fungal propagules in vine tissues via direct amplification by PCR without previous DNA purifying. This method's potential is illustrated by several examples. For this, different vine samples were crushed in the presence of polyvinylpolypyrrolidone and utilised directly as a matrix for PCR amplification using primers specific to the vine and to its three main fungal pathogens, *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* and *Botrytis cinerea*. The specificity of the amplifications was validated by PCR-product sequencing. Dilution series of the different fungal propagules studied revealed major sensitivity reactions for *P. viticola*, *B. cinerea* and *E. necator*, that is to say one single sporangium or conidium. Microscopy allowed visualisation of the spores and other fungal propagules within the plant tissues, particularly in the dormant buds or flowers of the vine, but not the identification of the present species, which was accomplished in parallel by direct PCR. Powdery mildew and grey mould were detected in 29 % and 65 % of the buds analysed, respectively. Downy mildew was detected in leaves in field right after potentially infectious rainfall or dewfall. Grey mould was detected in asymptomatic flowers after visualisation by microscopy and identified by direct PCR. Microscopy observations revealed the presence of hyphae in asymptomatic stalks, and direct PCR enabled the identification of *P. viticola*. The validation and utilisation of this method are discussed as a supplement to microscopy, particularly for the study of the epidemiology of biotrophic fungi non-cultivable on artificial growth media.

**Key words:** downy mildew, powdery mildew, grey mold, direct PCR, buds, leaves, rachis, flowers, grapevine.

### Riassunto ■ Uno strumento molecolare per rivelare precocemente peronospora, oidio e marciume grigio nei tessuti della vite

Un metodo semplice e affidabile è stato proposto per rilevare propaguli fungini nei tessuti della vite per mezzo dell'amplificazione diretta con PCR, senza previa purificazione del DNA. Il potenziale di un simile metodo viene illustrato per mezzo di alcuni esempi. A questo scopo, sono stati frantumati diversi campioni di vite in presenza di polivinilpolipirrolidone, poi utilizzati direttamente come matrice per l'amplificazione con PCR per mezzo di inneschi specifici per la vite e i sui tre principali patogeni fungini, *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* e *Botrytis cinerea*. La specificità delle amplificazioni è stata convalidata attraverso il sequenziamento dei prodotti della PCR. Alcune serie di diluizione di diversi propaguli fungini hanno permesso di dimostrare un'elevata sensibilità delle reazioni per *P. viticola*, *B. cinerea* ed *E. necator*, rispettivamente uno sporangio e un solo conidio. La microscopia consente di visualizzare le spore e altri propaguli fungini nei tessuti vegetali, in particolare nelle gemme dormienti o nei fiori della vite, senza tuttavia permettere di identificare le specie presenti, cosa che invece è stata fatta in parallelo con la PCR diretta. L'oidio e il marciume grigio sono stati rilevati rispettivamente nel 29 e nel 65 % delle gemme analizzate. La peronospora è stata rilevata in foglie in campo subito dopo episodi di pioggia o di rugiada potenzialmente infettive. Il marciume grigio è stato rilevato nei fiori asintomatici dopo la visualizzazione al microscopio e l'identificazione tramite la PCR diretta. Alcune osservazioni al microscopio hanno mostrato la presenza di ife nei rachidi asintomatici, mentre la PCR diretta ha permesso di identificare la *P. viticola*. Si discute della convalida e dell'utilizzo di questo metodo come complemento alla microscopia, soprattutto per lo studio dell'epidemiologia di funghi biotrofi non coltivabili in ambienti di crescita artificiali.