





# Thèse

pour le doctorat de l'Université Bordeaux 2

Mention: Sciences, Technologie, Santé Option: Biologie Végétale

Ecole Doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2012

# Mélanie ROUXEL

Ecologie et évolution de l'interaction *Plasmopara viticola / Vitis* spp. et évaluation des risques de contournement de la résistance de la vigne au mildiou

### Membres du Jury

Christian LANNOU, Directeur de Recherches, INRA, Grignon Eva STUKENBROCK, Chercheur, Max Planck Institute, Allemagne Régine DELOURME, Directrice de Recherches, INRA, Rennes Marie-Laure DESPREZ-LOUSTAU, Directrice de Recherches, INRA, Bordeaux Pere MESTRE, Chargé de Recherches, INRA, Colmar (co-encadrant de thèse) François DELMOTTE, Chargé de Recherches, INRA, Bordeaux Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Co-directeur Directeur de thèse

Année 2012

Thèse n°2023

# Thèse

pour le doctorat de l'Université Bordeaux 2

Mention: Sciences, Technologie, Santé Option: Biologie Végétale

Ecole Doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2012

Mélanie ROUXEL

# Ecologie et évolution de l'interaction *Plasmopara viticola / Vitis* spp. et évaluation des risques de contournement de la résistance de la vigne au mildiou

Membres du Jury

Christian LANNOU, Directeur de Recherches, INRA, Grignon Eva STUKENBROCK, Chercheur, Max Planck Institute, Allemagne Régine DELOURME, Directrice de Recherches, INRA, Rennes Marie-Laure DESPREZ-LOUSTAU, Directrice de Recherches, INRA, Bordeaux Pere MESTRE, Chargé de Recherches, INRA, Colmar (co-encadrant de thèse) François DELMOTTE, Chargé de Recherches, INRA, Bordeaux Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Co-directeur Directeur de thèse

# RESUME

La compréhension du processus d'adaptation des populations de parasites à leur plante-hôte est une question fondamentale en écologie évolutive. C'est également un enjeu majeur de recherche finalisée qui a des retombées pour la protection des cultures. L'oomycète *Plasmopara viticola*, agent causal du mildiou de la vigne, attaque les espèces du genre *Vitis*. Dans un contexte où l'enjeu principal des programmes d'amélioration est la durabilité des résistances, des connaissances nouvelles sur l'écologie et l'évolution de l'interaction entre le parasite et son hôte sont nécessaires afin d'évaluer le potentiel du mildiou à surmonter ces résistances. Dans ma thèse, je me suis intéressée au rôle de la plante-hôte comme facteur d'évolution des populations de mildiou, en posant cette question à différentes échelles évolutives : (i) dans le bassin d'origine du pathogène (Amérique du Nord), j'ai cherché à évaluer le degré de spécialisation du parasite sur sa gamme d'hôtes sauvages et cultivés; (ii) en Europe, où le mildiou de la vigne a été introduit récemment, j'ai étudié l'évolution des populations de mildiou soumis à la pression de sélection des résistances des nouvelles variétés de vigne.

Pour comprendre la spécialisation plante-hôte dans ce pathosystème où plusieurs espèces cryptiques ont été identifiées, nous avons réalisé des tests d'inoculations croisées entre espèces hôtes (*Vitis* spp.) et agent pathogène (*P. viticola*). Les données phénotypiques et morphologiques apportent les preuves d'une spécialisation plante-hôte au sein des populations de *P. viticola* : les espèces A et D de mildiou sont spécialisées sur leur plante-hôte, tandis que le processus de spécialisation est en cours pour les espèces B et C. Même si aucune différenciation génétique n'a été montrée au sein de l'espèce C, il existe deux groupes distincts au sein de l'espèce B. Les isolats du compartiment cultivé sont en moyenne plus agressifs que les isolats issus des vignes sauvages, indiquant une adaptation des isolats cultivés sur leur plante hôte. A partir d'un large échantillonnage, nous avons étudié la distribution des espèces de mildiou sur leurs plantes-hôtes sauvages et cultivées. Ce travail a permis d'identifier une nouvelle espèce cryptique et a confirmé la spécialisation plante-hôte.

En Europe, nos résultats montrent que le déploiement limité de variétés à résistantes partielles a conduit à des modifications des populations de mildiou: apparition d'isolats virulents (i.e. contournant un QTL majeur de résistance), et augmentation de l'agressivité sur *Vitis vinifera*. Dans le but de comprendre les mécanismes à l'origine de la spécialisation et du contournement des résistances, nous nous sommes intéressés au répertoire d'effecteurs du parasite. Une centaine d'effecteurs candidats ont été identifiés en utilisant les données disponibles sur le génome de *P. viticola*. L'analyse du polymorphisme de 32 candidats sur une sélection d'isolats montre que trois d'entre eux évoluent sous sélection positive.

Ces résultats soulignent l'importance de la plante-hôte comme facteur de diversification des populations de l'agent pathogène et révèlent que le mildiou s'adapte rapidement aux résistances de la vigne. Il est désormais nécessaire de mieux appréhender le déploiement des résistances de la vigne afin qu'elles puissent être durables.

Mots clé: Interaction hôte-parasite, maladie émergente, mildiou, spécialisation plantehôte, vigne.

## TITLE

Ecology and evolution of the *Plasmopara viticola* / *Vitis* spp. interaction and risk assessment for grapevine downy mildew resistance breakdown

## ABSTRACT

Understanding the process of adaptation of parasite populations to their host-plant is a key issue in evolutionary ecology. It is also a major subject in applied research that has implications for crop protection. The oomycete *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew, attacks the species of the *Vitis* genus. In a context where the main concern of the breeding programs is the durability of resistance, new knowledge about the ecology and evolution of the interaction between parasite and host is needed in order to evaluate the potential of downy mildew to overcome the resistance. In my thesis, I addressed the role of the host-plant as an evolutionary factor for downy mildew populations, by asking this question at two different evolutionary scales: (i) in the pathogen region of origin (North America) I assessed the degree of specialization of the parasite on its wild and cultivated host range (ii) in Europe, where downy mildew has been introduced recently, I studied the evolution of downy mildew populations subject to the selection pressure imposed by resistant grapevine varieties.

To understand the host-plant specialization in this pathosystem, where several cryptic species have been identified, we performed cross inoculations between different host (*Vitis* spp.) and pathogen (*P. viticola*) species. Morphological and phenotypic data provide evidence of host-plant specialization in *P. viticola* populations: downy mildew species A and D are specialized on their host-plant, while the specialization process is ongoing for species B and C. Although no genetic differentiation has been shown inside species C, there are two distinct groups within species B. Isolates from the cultivated compartment are on average more aggressive than isolates from wild vines, indicating an adaptation of isolates growing on cultivated host-plants. Finally, a large-scale study of the distribution of downy mildew species on both their wild and cultivated host-plants resulted in the identification of a new cryptic species and confirmed the host-plant specialization.

In Europe, our results show that the limited deployment of resistant varieties has led to changes in downy mildew populations: emergence of virulent isolates (i.e. breakdown of a major QTL for resistance), and increased aggressiveness on *Vitis vinifera*. In order to understand the mechanisms at the origin of specialization and resistance breakdown, we examined the parasite's effector repertoire. Over one hundred effector candidates were identified using available data on the *P. viticola* genome. The polymorphism of 32 candidate genes revealed that three of them evolve under positive selection.

Our results reveal the strong ability of downy mildew to adapt to its host plant and to plant resistance. They should be taken into account when devising strategies for the deployment of grapevine resistances in order to guarantee their durability.

**KEYWORDS :** Host parasite interaction, disease emergence, host-plant specialization, grapevine

### **AVANT PROPOS**

Cette thèse en Biologie Végétale de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bordeaux 2, d'une durée de trois ans, a été financée par la Fondation Jean Poupelain (Jonzac, France) et l'INRA (départements « Santé des Plantes et Environment » et « Génétique et Amélioration des Plantes »). Ce travail a été principalement réalisé au sein de l'UMR 1065 Santé et Agro-écologie du Vignoble de l'INRA de Bordeaux. Des séjours de 5 et 4 mois respectivement ont été réalisés à l'UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin de l'INRA de Colmar et dans dans le laboratoire d'Annemiek Schilder de Michigan State University (Lansing, USA).

## **REMERCIEMENTS**

Tous mes remerciements s'adressent en premier lieu à François Delmotte, qui fut « mon » directeur de thèse attentionné et disponible, qui m'a dévoilé les plaisirs de la science et de la recherche. Merci pour le temps accordé à nos nombreuses, longues et passionnantes discussions scientifiques qui à chaque fois nous entraînent à revisiter notre intérêt commun pour ce cher, tendre et magnifique oomycète ! Merci de m'avoir donné pleine confiance au quotidien, autant au laboratoire de Bordeaux que lors de mes travaux extérieurs. Merci d'avoir su me transmettre l'intérêt d'une étude qui ne concerne pas seulement le mildiou mais aussi le monde de la vigne et du vin !

Je remercie Pere Mestre, mon co-encadrant, pour sa collaboration, son accueil, et, malgré la distance les nombreux échanges constructifs et enrichissants. Merci de m'avoir épaulé pour compléter mes expérimentations. Merci de m'avoir appris à explorer le mildiou dans sa dimension génomique !

Pere, François, merci pour votre encadrement. Merci pour nos rendez-vous mensuels en visioconférence à quatre : vous, moi et le mildiou !

Viennent ensuite les trois différents laboratoires dans lesquels j'ai pu disposer de tous les moyens nécessaires à mes travaux.

Merci à Denis Thièry, directeur de l'UMR Santé et Agroécologie du Vignoble qui m'a accueillie durant ces trois années.

Merci à Didier Merdinoglu, animateur de l'équipe Génétique et Amélioration de la Vigne de l'UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin de Colmar pour son accueil lors de mes venues ponctuelles en Alsace.

Merci à Anemieck Schilder de m'avoir accueillie dans son laboratoire Small Fruits Pathology, à East-Lansing, Michigan State University. Merci de m'avoir permis de réaliser mes expérimentations aux Etats-Unis et de m'avoir mise en relation avec les viticulteurs du Michigan. Une pensée particulière pour Jerri qui m'a facilité la vie durant mon séjour !

Je remercie également tous ceux qui ont suivi mon aventure de près avec un regard extérieur toujours utile et qui ont contribué, ainsi, au bon déroulement de ma thèse : Laurent Delière, Daciana Papura et Agnès Calonnec.

Je tiens particulièrement à remercier chacun des participants de mon comité de thèse : Benoit Moury, Tatiana Giraud, Sébastien Duplessis, Manuel Plantegenest. Merci pour vos conseils, les décisions prises et les orientations choisies.

Tous mes remerciements s'adressent également à mes rapporteurs et examinateurs pour leur disponibilité et leur contribution à enrichir mon travail par leurs appréciations : Christian Lannou, Eva Stukenbrock, Régine Delourme, Marie-Laure Desprez-Loustau.

Merci également à la Fondation Jean Poupelain (Javrezac, France), co-financeur sans qui cette thèse n'aurait peut-être pas existée et grâce à laquelle j'ai pu disposer des moyens techniques indispensables à mes investigations.

Je remercie le secrétariat et tout particulièrement Marie Lauwerier pour avoir, avec patience et ténacité, complété mes innombrables documents indispensables à ma mission outre Atlantique.

Merci à toute l'équipe de l'UMR SAVE qui m'a accuillie très chaleureusement.

Je pense particulièrement à mes collègues de bureau et de thèse, Emilie et Jonathan, et à Laeticia qui nous a rejoint en cours de route. Merci pour votre soutien et nos discussions divers et variées autour de la thèse ou non. Bon courage à vous, c'est bientôt la fin de la thèse et le début d'une nouvelle aventure.

Je pense aussi à tous ceux avec qui j'ai passé des moments de détente au travail mais aussi autour d'un barbecue, d'un verre : Sylvie, Amandine, Sylvain, Jessica, Virginie, Lionel, Pascale, Marie-Cécile, Carolina, Olivier, Karine, Jerôme.

Merci à Lisette qui m'a appris à cultiver et à materner mon cher mildiou. Et merci à tous ceux qui ont participés de près ou de loin à ma thèse.

Une pensée pour Damien et Florian qui, en tant que stagiaires, ont participé à ce travail.

Merci à toute l'équipe de l'UMR SVQV pour son accueil chaleureux à Colmar. Merci Marie-Christine pour ton aide. Merci à Elisa, Sophie et les autres, mes collègues de l'unité de Colmar pour leur soutien et les virées alsaciennes.

Thank you to the Lansing Fruity Team ! Laura, Tim, Srdjan, Alenjandro, Luisa, Jerri, Amber, Shijian, Dana, Jessy. I miss you and I will never forget the great times we spent together. Thanks a lot for your warm welcome and for your patience and indulgence towards my English that I have greatly improved thanks to you. Laura, thank you very much for guiding me to find vineyards and introduce me to the great Michigan State Latino American community.

Ha ! Je ne remercie pas les Japaneese Beattles qui ont pris un malin plaisir à manger mes jeunes feuilles de vigne. Je ne remercie pas non plus les machines de séquençage, et autres, qui font des leurs au mauvais moment.

Enfin, je remercie toute ma famille, en particulier mes parents et mes frères pour leur soutien inconditionnel tout au long de ma thèse et de mes études. Merci pour ces longues heures passées au téléphone à discuter de la pluie et du beau temps, des enfants qui grandissent et de la prochaine date à laquelle je vais pouvoir rentrer en Bretagne. Je remercie aussi Pauline et Alain pour leur soutien et l'intérêt qu'ils portent à mon travail.

Le dernier de mes remerciements est pour toi, Clément. Merci mille fois de m'avoir soutenue, épaulée et encouragée au cours de cette aventure et plus particulièrement ces dernières semaines où j'ai passé plus de temps avec mon ordinateur qu'avec toi. Merci pour tout ce que tu m'apportes dans la vie de tous les jours.

J'ai passé trois ans d'une grande intensité, je suis très heureuse d'avoir pu découvrir le monde de la vigne et étudier mon cher mildiou !

Merci !

# **TABLE DES MATIERES**

Introduction générale	1
L'adaptation à l'hôte chez les champignons phytopathogènes	3
La spéciation écologique et l'émergence des pathogènes	3
Adaptation locale versus spécialisation	4
Co-évolution plante-pathogène	5
Résistance quantitative versus qualitative	7
La reconnaissance entre plantes et agents pathogènes	8
Mécanismes de reconnaissances hôte-agent pathogène	8
Effecteurs libérés par les agents pathogènes	8
Reconnaissance des effecteurs par les protéines de résistance de la plante	e 10
Durabilité des résistances	12
L'interaction Vitis spp. / Plasmopara viticola	16
Phytogéographie et histoire de la vigne	16
Le mildiou de la vigne	18
L'amélioration variétale de la vigne pour la résistance au mildiou	23
Objectifs de la thèse	25
Chapitre 1 : Spéciation et spécialisation plante-hote du mildiou de la vigne dans son aire géographique d'origine	27
Préambule	29
<b>1.1 Spécialisation plante-hôte des espèces cryptiques de </b> <i>Plasmopara viticola</i> 1.1.1 Phylogenetic and experimental evidence for host-specialized cryptic	31
species in a biotrophic oomycete	31
τ. 1	

1.1.1 Thylogenetic and experimental evidence for nost specialized eryptic	
species in a biotrophic oomycete	31
Introduction	31
Materials and methods	34
Results	36
Discussion	47
1.1.2 Distribution des espèces cryptiques de <i>Plasmopara viticola</i> sur les	
Vitis spp. du Nord-Est américain	57
Introduction	57
Matériel et méthodes	57
Résultats et discussion	58
1.2 Structure génétique au sein des espèces cryptiques de <i>P. viticola</i>	63
1.2.1. Microsatellite markers for the characterization of native and	
introduced populations of Plasmopara viticola, the causal agent of	
grapevine downy mildew	64
Introduction	64
In silico research of microsatellite markers	65
Amplification tests	67
Polymorphism analysis	67
Conclusion	69
Supplementary information	70
1.2.2. Structure génétique des populations des espèces B et C de P. viticola	
en fonction de la plante-hôte	71
-	

Introduction	71
Matériel et méthodes	71
Résultats	73
Discussion	77
1.3. Conclusion générale	79

Chapitre 2 : Evolution des populations de mildiou face aux résistances de la vigne	81
2.1. Introduction	83
2.2. Matériel et méthodes	87
Matériel végétal	87
Isolats de <i>Plasmopara viticola</i>	87
Test de pathogénicité	89
Caractérisation moléculaire	91
2.3. Résultats	92
Evaluation de la virulence et de l'agressivité d'isolats face à un	
panel de génotypes à résistances connues	92
Evolution de l'agressivité d'isolats face à des résistances quantit	atives
de variétés commercialisées	92
Caractérisation moléculaire et phylogénétique	95
2.4. Discussion	101
Contournement de résistances	103
Erosion de la résistance quantitative et évolution de l'agressivité	105

# Chapitre 3 : Identification et caractérisation d'effecteurs candidats de *Plasmopara viticola* impliqués dans la virulence

109

3.1. Introduction	111
3.2. Identification d'effecteurs candidats de <i>Plasmopara viticola</i>	114
Ressources génomiques	114
Recherche de gènes candidats dans la banque d'ADNc	114
Validation des gènes candidats par amplification et séquençage	115
Confrontation des gènes candidats identifiés à la banque d'ADNg	117
3.3. Analyse du polymorphisme et de la sélection exercée sur les effecteurs	
candidats de Plasmopara viticola	120
3.4. Discussion	124
Identification de gènes candidats de Plasmopara viticola impliqués	
dans la virulence	124
Caractérisation des gènes candidats	125
Discussion générale	133
La plante-hôte, facteur de spéciation dans les populations sauvages de	
mildiou de la vigne	135
Conquête des hôtes cultivés et modification du pouvoir pathogène	136
Implications pour l'épidémiologie du mildiou au vignoble	138
Vers une gestion durable de la résistance de la vigne	140



- Introduction générale -

## L'adaptation à l'hôte chez les champignons phytopathogènes

#### La spéciation écologique et l'émergence des pathogènes

La spéciation écologique est un mécanisme important de diversification des espèces. La sélection de traits adaptatifs à des niches écologiques différentes peut engendrer un isolement reproducteur entre populations, en l'absence de barrières géographiques. Dans le cas des champignons phytopathogènes, des études théoriques (Giraud *et al.* 2006 ; Giraud *et al.* 2010) montrent que la spécialisation à la plante-hôte pouvait, de manière pléiotropique, conduire à un isolement reproducteur entre populations : en effet, chez les champignons Ascomycètes la mise en place de barrières aux flux de gènes est facilitée par l'absence de migration entre le développement du pathogène sur l'hôte et la reproduction (Giraud *et al.* 2006, 2008, 2010, Gladieux *et al.* 2011; Servedio *et al.* 2011). En d'autres termes, des espèces spécialisées dans des niches écologiques différentes ne nécessiteraient pas qu'un isolement reproducteur actif se mette en place (gènes spécifiques contrôlant le choix de l'hôte ou le choix du partenaire sexuel) pour maintenir une différenciation génétique en sympatrie, puisque l'adaptation à leur niche restreindrait les flux de gènes.

Giraud *et al.* (2010) suggèrent qu'un certain nombre de facteurs et de traits d'histoire de vie des champignons phytopathogènes peuvent faciliter une divergence écologique rapide des populations : (1) une forte sélection diversifiante imposée par les hôtes, (2) un grand nombre de spores qui augmente la possibilité de survie sur un nouvel hôte et les niveaux de variation

génétique créés par les mutations, (3) la reproduction sur l'hôte (biotrophie) créant une pléiotropie entre l'adaptation à l'hôte et le mode de reproduction, (4) un nombre limité de gènes impliqués dans la spécificité des interactions hôte-pathogène et (5) la reproduction asexuée fréquente avec des événements rares de recombinaison sexuelle.

L'émergence de nouveaux agents pathogènes peut résulter de différents mécanismes évolutifs (Stukenbrock et McDonald, 2008). Un agent pathogène peut évoluer en suivant son hôte au cours de sa domestication, comme par exemple

# Boite 1. Saut d'hôte / expansion de gamme d'hôte

**Saut d'hôte (Host shift) :** colonisation d'un nouvel hôte par un sous-ensemble de la population d'agents pathogènes qui va se spécier sur le nouvel hôte (l'agent pathogène présent sur le nouvel hôte ne peut pas infecter l'hôte ancestral).

**Expansion de la gamme d'hôte (Host range expansion) :** colonisation d'un nouvel hôte en plus de l'hôte d'origine (l'agent pathogène peut toujours infecter l'hôte d'origine).

En fonction des auteurs, les définitions diffèrent. Certains les définissent en fonction de la capacité ou non d'infection de l'hôte ancestrale (Giraud *et al.* 2010, Gladieux et al. 2011, LeVan et al. 2012) et d'autres en fonction de la proximité génétique entre les hôtes infectés (Stukenbrock et McDonald 2008, Schulze-Lefert et Panstruga 2011).

dans le cas de la tavelure du pommier (Gladieux et al. 2010), ce qui est nommé en anglais le 'host-tracking' traduit en français par 'co-divergence' avec l'hôte. Un agent pathogène peut également acquérir la capacité d'infecter un nouvel hôte et réaliser un saut d'hôte (Boite 1). Par exemple, le pathogène Rynchosporium secalis a émergé sur le seigle à partir d'une graminée sauvage, puis est passé sur l'orge (Zaffarano et al. 2008). Différents mécanismes proximaux conduisant au saut d'hôte ont été décrits chez les pathogènes de plantes : ainsi, l'émergence de Pyrenophora tritici-repentis sur le blé serait vraisemblablement due à un transfert de gène codant pour une toxine de Stagnospora nodorum (Friesen et al. 2006). L'hybridation d'agents pathogènes appartenant à des espèces différentes peut également conduire à la conquête de nouveaux hôtes comme dans le cas de la maladie des Aulnes en Europe causée par Phytophthora alni issus de plusieurs évènements d'hybridation (Brasier et al. 2000). Dans les agrosystèmes, le scenario le plus fréquent et potentiellement le plus dévastateur est certainement l'émergence par saut d'hôte (Stukenbrock et McDonald 2008, De Vienne et al. 2009, Giraud et al. 2010). L'apparition de nouvelles mutations ou la sélection de mutations avantageuses permettent par la suite d'augmenter le potentiel adaptatif du pathogène nécessaire à la colonisation de l'hôte récemment conquis (Stukenbrock et McDonald 2008; Schulze-Lefert et Panstruga 2011).

#### Adaptation locale versus spécialisation

Il peut y avoir une confusion entre l'effet de l'adaptation locale et la spécialisation à l'hôte (Sicard et al. 2007) (Boite 2). L'adaptation locale (meilleure performance sur son hôte sympatrique) résulte de l'évolution rapide des parasites à l'hôte le plus commun dans la population (Hamilton et al. 1990). Plusieurs facteurs écologiques favorisent l'adaptation locale tels que des tradeoff entre les performances sur des hôtes différents et des flux de gènes limités chez l'hôte et le parasite conduisant à la différentiaton des populations (Kawecki et Ebert 2004). La spécialisation évolue lorsque des espèces de

#### Boite 2. Adaptation locale / Spécialisation

Adaptation locale à une plante-hôte : être meilleur sur sa plante-hôte que tous les autres isolats venant d'autres plantes-hôtes.

 $\rightarrow$  Les isolats 1 et 2 se sont adaptés localement aux plantes 1 et 2 respectivement. L'isolat 3 n'est pas adapté localement.

**Spécialiste d'une plante hôte**: être meilleur sur sa plante-hôte que sur toutes les autres plantes.

 $\rightarrow$  Les isolats 1 et 3 sont spécialistes des plantes 1 et 2 respectivement. L'isolat 2 n'est spécialiste d'aucune plante.



D'après (Joshi et Thompson 1995, Sicard et al. 2007)

plantes-hôtes diffèrent par leur niveau de résistance, physiologie, ou leur histoire de vie. La spécialisation résulte alors de l'adaptation du parasite à l'espèce qu'il rencontre le plus souvent dans son environnement. La spécialisation peut être qualitative, impliquant

Boite 3. Virulence / agressivité (Van der Plank 1968, Pariaud *et al.* 2009)

Virulence (ou pathogénicité) : capacité d'un agent pathogène à infecter un hôte (composante qualitative du pouvoir pathogène)

**Agressivité :** quantité de dommages infligés à l'hôte (composante quantitative du pouvoir pathogène)

l'impossibilité d'un agent pathogène d'infecter d'autres espèces que ses espèces hôtes (relation non hôte, virulence) ou quantitative, impliquant une agressivité plus faible sur les hôtes non habituels (Boite 3).

#### **Co-évolution plante-pathogène**

Dans les conditions naturelles, le pathogène s'adapte pour être capable d'infecter son hôte, et l'hôte s'adapte en retour pour se défendre contre le pathogène. Hôte et pathogène s'imposent donc des pressions de sélection antagonistes qui conduisent à la co-évolution (Thompson 1999). La co-évolution n'est possible que si les traits qui conduisent à l'adaptation réciproque

sont héritables d'une génération à l'autre. Dans le cas de l'adaptation qualitative à l'hôte, un modèle génétique de reconnaissance entre plantes et agents pathogènes a été formulé par Flor (1971) sous le nom de relation gène-pourgène (Boite 4). La relation gène-pour-gène, basée sur des travaux conduits sur l'agent de la rouille foliaire du lin (Melampsora lini), décrit le fait qu'à chaque gène de résistance de l'hôte correspond un gène d'avirulence du parasite. La reconnaissance de l'agent pathogène par la plante est déterminée par l'interaction, directe ou indirecte, entre le produit d'un gène de la plante (gène de résistance R) et le produit d'un gène de l'agent pathogène (gène d'avirulence Avr) (Boite 4). L'interaction AVR-R déclenche une réponse immédiate de la plante appelée





La plante possède un unique locus avec deux allèles possibles : un pour la résistance (R), et un pour la sensibilité (r). L'agent pathogène possède le locus correspondant pour l'interaction, avec également deux allèles : un pour l'avirulence (AVR) et un pour la virulence (avr). Si un agent pathogène AVR attaque une plante R, l'interaction est incompatible : la plante met en place des mécanismes de défense induisant la résistance. Dans les autres cas (présence du gène avr et/ou r), il n'y a pas de reconnaissance entre l'agent pathogène et l'hôte, l'interaction est alors compatible et le pathogène se développe (cf. Brown et Tellier 2011 pour une revue sur ce modèle). réponse d'hypersensibilité (HR pour '*Hypersensitive Response*'). La plante provoque ellemême une mort cellulaire localisée au point d'infection, qui a pour objectif de limiter la croissance de l'agent pathogène.

Dans les pathosystèmes cultivés, la plante évolue par l'intermédiaire de l'intervention humaine qui modifie les variétés. Des adaptations rapides des pathogènes sont régulièrement observées chez les champignons, notamment vis-à-vis des gènes majeurs de résistance (Stukenbrock et McDonald 2008). En effet, la résistance apportée par des gènes R est largement utilisée dans les programmes d'amélioration variétale du fait de son caractère monogénique. Ils apportent généralement un haut niveau de résistance entrainant une très forte pression de sélection sur les populations qui s'adaptent rapidement à la résistance grâce à la sélection de nouveaux effecteurs ou la délétion de l'effecteur reconnu par la plante. Ainsi, l'utilisation de variétés portant des gènes majeurs de résistance qualitative se traduit par des cycles successifs de « boom and bust ». Le « boom » correspond au déploiement à grande échelle d'une variété possédant un gène de résistance qualitative, et le « bust » correspond à l'adaptation des populations d'agents pathogènes. Le cycle de « boom and bust » se déroule en quatre étapes : (i) sélection d'un hôte résistance de l'hôte, (iii) déclin de la fréquence de la résistance puisque la virulence est commune (la variété n'est plus utilisée puisque la

résistance n'apporte plus d'avantage), (iv) déclin de la fréquence de la virulence quand la résistance est rare (pour revue Brown et Tellier 2011). Le contournement de ces résistances (inefficacité du gène de résistance qualitative) peut avoir lieu quelques années seulement après leur déploiement dans les cultures. Cependant, certains gènes de résistance monogénique durables ont été rapportés pour les virus (Goulden *et al.* 1993, Garcia-Arenal et McDonald 2003, Kang *et al.* 2005) et pour les champignons (Jorgensen 1992, Spielmeyer *et al.* 2005).

#### **Boite 5. Résistances variétales**

La résistance totale aux maladies, aussi nommée résistance qualitative confère une absence de maladie. Cette résistance est généralement contrôlée par un gène majeur qui conduit à une distribution discrète de phénotypes de la maladie dans une population en ségrégation (Poland *et al.* 2009, Young 1996). Cette résistance correspond à une interaction de type gène pour gène (Flor 1971) impliquant, dans la majorité des cas, des gènes de résistance de type NB-LRR. La résistance totale contrôlée par un gène majeur confère souvent une résistance hôte-spécifique.

La résistance partielle aux maladies, aussi nommée résistance quantitative aux maladies (ou QDR pour Quantitative Disease Resistance) conduit à une réduction de la maladie (Poland 2009, Young 1996). Cette résistance conduit à une distribution continue de phénotypes dans une population en ségrégation. Contrairement à la résistance qualitative, qualifiée de hôte-spécifique, la QDR tend à être efficace contre toutes les souches d'une population pathogène.

#### Résistance quantitative versus qualitative

Chez les plantes, deux types de résistance, dont la détermination et la caractérisation diffèrent en fonction du domaine d'étude et du critère de comparaison, sont régulièrement mis en opposition (Boite 5). En génétique, on oppose « gènes majeurs » à « gènes mineurs » pour décrire les bases de ces résistances et leurs effets. Du point de vue phénotypique, on oppose « résistance complète » et « résistance partielle » pour décrire le degré d'expression de résistance de la plante. En statistiques, on oppose « résistance verticale/qualitative » et « résistance horizontale/quantitative » lorsqu'il est fait référence à la distribution de la fréquence des plantes sensibles et résistantes en ségrégation dans une population. En épidémiologie, on oppose « résistance spécifique » et « résistance non-spécifique/à spectre large » pour définir l'étendue de la gamme d'hôte d'agents pathogènes vis-à-vis desquels la résistance est efficace. Cette terminologie diverse et complexe conduit à des ambiguités quand aux relations entre phénotypes et génotypes. En effet, des auteurs associent généralement la réponse immunitaire primaire (PTI) avec une résistance de type quantitative à large spectre de résistance, et la réponse immunitaire secondaire (ETI) à résistance gouvernée par un gène R et une résistance spécifique. Cependant, la distinction entre les deux catégories de résistance (R et QDR) n'est pas délimitée et il existe un continuum entre les deux (Poland et al. 2009, Thomma 2011). En effet, il est maintenant reconnu que les résistances quantitatives peuvent être spécifiques, ce qui pourrait s'expliquer par la relation de gène mineur pour gène mineur (Poland et al. 2009). Cette spécificité d'isolats a été montrée dans de nombreux pathosystèmes faisant intervenir des variétés présentant des résistances partielles dont: riz / Magnaporthe orizae (Ballini et al. 2008), pomme de terre / Phytophthora infestans (Rauscher et al. 2010), luzerne tronquée / Aphanomices euteiches (Hamon et al. 2010), orge / Puccinia hordei (Marcel et al. 2008), peuplier / Melampsora larici-populina (Dowkiw et al. 2010). Parallèlement, dans le cas du mildiou de la pomme de terre, le gène Rpi-mcd1 a été décrit, dans un premier temps, comme un QTL provenant de Solanum microdontum. Plus tard, il a été montré que ce gène correspond finalement à un gène de résistance R classique (Tan et al. 2008). Il parait donc beaucoup plus utile de décrire la distribution observée des phénotypes de résistance aux maladies séparément de toutes les hypothèses non vérifiées concernant la base génétique sous-jacente (Saint Clair 2010).

#### La reconnaissance entre plantes et agents pathogènes

#### Mécanismes de reconnaissance hôte-agent pathogène

Le modèle de relation gène-pour-gène représente toujours l'un des fondements de la reconnaissance plante pathogène. Cependant, un modèle plus récent - dit en ZigZag - a été proposé par Jones et Dangl (2006). Ce modèle postule que les plantes répondent à une infection par un système immunitaire inné à deux niveaux : le premier reconnaît et répond aux molécules communes d'un grand nombre de parasites (réponse immunitaire primaire), le deuxième répond aux facteurs de virulence des agents pathogènes (réponse immunitaire secondaire) suivant le modèle gène-pour-gène de Flor (Flor 1971). Ce modèle en ZigZag se décompose en 4 phases (Figure 1).



Figure 1 : Représentation schématique du modèle en ZigZag (extrait de Jones et Dangl 2006). Phase 1 : Des éliciteurs généraux (MAMPs/PAMPs, Microbe/Pathogen Associated Molecular Patterns) libérés par l'agent pathogène sont reconnus par des récepteurs de la plante (PRR, Pattern Recognition Receptors) déclenchant ainsi les mécanismes de défense de la plante (PTI, PAMP-Triggered Immunity). Ce premier niveau de reconnaissance correspond à la réponse immunitaire primaire. Phase 2 : l'agent pathogène va libérer des effecteurs qui vont interagir avec l'hôte et peuvent être capable de supprimer ou contourner la première barrière de défense (PTI), rendant ainsi la plante sensible (ETS, Effector-Triggered Immunity). Phase 3 : l'un des effecteurs délivrés par l'agent pathogène est reconnu par un gène de résistance de l'hôte, déclenchant les mécanismes de reconnaissance de la plante (ETI, Effector-Triggered Immunity). Ce deuxième niveau de reconnaissance correspond à la réponse immunitaire secondaire et provoque une réponse d'hypersensibilité induisant à la résistance de la plante. Phase 4 : les isolats de l'agent pathogène qui, via la sélection naturelle, ont perdu cet effecteur et/ou accumulé de nouveaux effecteurs peuvent supprimer de nouveau l'immunité de la plante.

#### Effecteurs libérés par les agents pathogènes

Afin de contourner ou supprimer les mécanismes de défense activés par le système immunitaire de l'hôte, les agents pathogènes secrètent des protéines et des molécules, identifiées sous le terme commun d'effecteurs. Ceux-ci permettent la colonisation des cellules

de l'hôte (Hogenhout *et al.* 2009). Chez les oomycètes, les effecteurs sont classés en deux groupes : d'une part, les effecteurs apoplastiques secrétés dans l'espace intercellulaire et d'autre part, les effecteurs cytoplasmiques transloqués par l'agent pathogène à l'intérieur de la cellule hôte (figure 2).

#### Les effecteurs apoplastiques

Parmi les effecteurs apoplastiques, un certain nombre de familles ont été identifiées au sein des génomes d'oomycètes : des protéines inhibitrices de protéases à sérines (de type Kazal) ont été identifiées chez *Phytophthora infestans*, *P. brassicae*, *P. halstedii*, *P. sojae* et *P. ramorum* (Tian *et al.* 2004, Tyler *et al.* 2006) ; des protéines inhibitrices de glucanases (GIP, Glucanase Inhibitor Protein) ont également été identifiées chez *P. sojae*, *P. ramorum* et *P. infestans* (Rose *et al.* 2002, Damasceno *et al.* 2008) ; des élicitines ont été identifiées chez *Phytophtora* et *Pythium* (Ponchet *et al.* 1999) ; des protéines NLP (NEP1-Like Protein) ont été identifiées chez *P. infestans*, *P. sojae* et *P. ramorum* et sont spécifiques de chaque espèce (Tyler *et al.* 2006, Qutob *et al.* 2006, Dong *et al.* 2012).

#### Les effecteurs cytoplasmiques

Même si tous les effecteurs sont dans un premier temps relargués dans l'espace apoplastique, un grand nombre d'entre eux sont ensuite transloqués dans le cytoplasme des cellules de l'hôte. Ces effecteurs peuvent alors interagir directement ou indirectement avec les protéines codées par les gènes de résistance R. Par conséquent, les gènes codant pour ces protéines constituent les gènes Avr.

Chez les oomycètes pathogènes de plantes, les premiers gènes d'avirulence à avoir été identifiés et clonés (Avr1b-1 de *P. sojae*, Avr3a de *P. infestans*, ATR13 et ATR1 de *Hyaloperonospora arabidopsidis*) ont permis de mettre en évidence le motif RxLR-dEER (Allen *et al.* 2004, Shan *et al.* 2004, Armstrong *et al.* 2005, Rehmany *et al.* 2005, Birch *et al.* 2006, Tyler *et al.* 2006). La connaissance de ce motif a conduit à l'identification d'autres effecteurs fonctionnant comme gènes d'avirulence : Avr1a, Avr3a, Avr3c, Avr4/6, de *P. sojae* (Dou *et al.* 2008, Qutob *et al.* 2009, Dong *et al.* 2009, Cheng *et al.* 2012), Avr4 et AvrBlb1 de *P. infestans* (van Poppel *et al.* 2008, Vleeshouwers *et al.* 2008, Bozkurt *et al.* 2011). Les génomes d'oomycètes contiennent un grand nombre de gènes codant pour des protéines prédites de type RxLR : 396 pour *P. sojae*, 374 pour *P. ramorum*, 563 pour *P. infestans*, 134 pour *H. arabidopsidis* (Jiang *et al.* 2008, Haas *et al.* 2009, Baxter *et al.* 2010). Les gènes codant pour des effecteurs RXLR se trouvent dans des régions hautement dynamiques du génome, ce qui joue un rôle crucial dans la capacité d'adaptation rapide des pathogènes à

#### leurs hôtes (Haas et al. 2009).

Les protéines RxLR sont constituées, en extrémité amino-terminale, d'un peptide signal suivi d'un motif conservé Arginine-x-Leucine-Arginine (RxLR, x étant n'importe quel acide aminé) pouvant lui-même être suivi d'un motif aspartate-Glutamate-Glutamate-Arginine (dEER). Le domaine RxLR est nécessaire et suffisant pour la translocation des protéines dans les cellules de l'hôte (Dou *et al.* 2008, Whisson *et al.* 2007). D'autres motifs dont la structure est proche (HxLR, RxFR, RxYR, RxMR, RxLQ, RxLG), permettent également la translocation des protéines dans les cellules de l'hôte (Kale *et al.* 2010). Certains effecteurs d'oomycètes présentent ces motifs RxLR-like, comme par exemples, le motif QxLR chez *Pseudoperonospora cubensis* (Tian *et al.* 2011), et le motif GRVR de la protéine ATR5 de *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Bailey *et al.* 2011).

Il existe également d'autres effecteurs cytoplasmiques appelés Crinkler (CRN) initialement identifiés sur des transcrits de *P. infestans* codant pour des protéines sécrétées et induisant des nécroses dans la plante (Torto *et al.* 2003, Kamoun 2006, Birch 2008). Cette famille diversifiée de protéines est présente dans un grand nombre de génomes d'oomycètes (Torto *et al.* 2003, Tyler *et al.* 2006, Gaulin *et al.* 2008, Haas *et al.* 2009, Lévesque *et al.* 2010). Les protéines de type CRN sont caractérisées par une partie N-terminale très conservée d'environ 50 acides aminés avec un domaine LFLAK et une partie C-terminale divergente (Haas *et al.* 2009). Ce motif, tel que pour les protéines RxLR, est nécessaire pour la translocation des protéines dans le cytoplasme des cellules de l'hôte (Schornack *et al.* 2010). Dans certains cas, les motifs RxLR et LFLAK sont présents sur la même protéine et forment le motif RxLRLFLAK (Haas *et al.* 2009). Les effecteurs de type CRN semblent être les effecteurs ancestraux puisqu'ils sont présents sur un plus grand nombre de génomes d'oomycètes que les RxLR (Schornack *et al.* 2010).

Une nouvelle classe d'effecteurs cytoplasmiques a été identifiée au sein du génome d'*Albugo laibachii*. Ces petites protéines prédites comme sécrétées présentent un motif CHxC (Cystéine, Histidine, x, Cystéine) en partie N-terminale (Kemen *et al.* 2011).

#### Reconnaissance des effecteurs par les protéines de résistance de la plante

Suite à la libération d'effecteurs du pathogène dans le milieu extra- ou intracellulaire de la plante, il peut y avoir reconnaissance de l'un d'entre eux par les protéines de résistance de la plante. Ces protéines décrites dans le règne végétal, impliquées dans la résistance de divers

agents biotiques (virus, champignons, bactéries, nématodes, ...), possèdent de fortes similarités de structure permettant de les distinguer en divers classes (voir pour revues Dangl et Jones 2001, Martin et al. 2003, Chisholm et al. 2006, Eitas et Dangl 2010, Elmore et al. 2011). La majorité des gènes identifiés et clonés contiennent un domaine riche en leucines répétées (LRR, Leucin Rich Repeats) participant à la reconnaissance de l'agent pathogène. La position cellulaire de ce motif permet de distinguer deux groupes : les protéines avec un motif LRR extracellulaire (nommées eLRR), et les protéines avec un motif intracellulaire. Il existe un certain nombre d'autres protéines R ne possédant pas de domaine LRR tel que Pto, qui est impliqué dans l'interaction entre *Pseudomonas syringae* et la tomate. Cette protéine possède un unique domaine sérine/thréonine kinase intracellulaire (Martin et al. 1993). Les protéines avec un domaine LRR intracellulaire possèdent un domaine central NB (Nucleotide Binding) et un motif N-treminal diversifié : TIR (Toll and human Interleukin 1 Receptor), CC (Coiled Coil), de type doigt de Zinc (BED-finger). Tous les gènes décrits impliqués dans la résistance chez les oomycètes pathogènes de plantes codent pour des protéines NB-LRR (Ballvora et al. 2002, Bhattacharyya et al. 2005, Bittner-Eddy et al. 2000, Botella et al. 1998, Gao et al. 2005, McDowell et al. 1998, Parker et al. 1997, Sandhu et al. 2004, Song et al. 2003, van der Vossen et al. 2003, van der Vossen et al. 2005, Wroblewski et al. 2007).



# Figure 2: Le rôle des effecteurs dans les interactions entre les champignons et leur plante-hôte (extrait de De Jonge et al. 2011)

Les champignons secrètent des effecteurs à l'interface entre l'agent pathogène et l'hôte après la pénétration dans l'hôte (1). Certains effecteurs contribuent à la virulence du champignon par des hyphes protégés contre les enzymes hydrolytiques de défense de l'hôte dans l'interface hôtepathogène (2), en inactivant ces enzymes (3), ou en nettovant les molécules PAMP potentielles (4) qui peuvent alerter la défense de l'hôte (5). De nombreux effecteurs ne restent pas dans l'interface hôte-agent pathogène, mais sont transportés vers cytoplasme hôte sans l'utilisation d'une le machinerie de translocation (6). Bien que le mécanisme moléculaire, expliquant comment les effecteurs transférés contribuent à la virulence du champignon, reste en grande partie obscure, certains d'entre eux sont susceptibles d'affecter les processus cytoplasmiques liés à la défense de l'hôte (7). Des données récentes suggèrent que certains effecteurs sont transportés vers le noyau où ils peuvent réguler la transcription de gènes cibles (8). La reconnaissance des effecteurs de l'agent pathogène par l'hôte se produit à travers

les récepteurs de surface cellulaire à l'interface hôte-pathogène (9), ou dans le cytoplasme hôte par l'intermédiaire de récepteur de type NB-RLR (10).

## Durabilité des résistances

Selon Johnson (1979), une résistance est durable si elle est efficace pendant une longue période, sur de grandes surfaces de culture et dans des conditions favorables au développement de l'agent pathogène. Dans cette définition, il apparait difficile de prédire la durabilité d'une résistance avant son déploiement au champ. Cependant, un certain nombre de travaux récents ont montré qu'il existe des facteurs déterminants qui contibuent à faire durer dans le temps une résistance de plante. Mieux les quantifier dans les pathosystèmes permet de prédire la durabilité d'une résistance.





(i) Déterminisme génétique de l'interaction entre l'hôte et le pathogène. Nous avons vu qu'un déterminisme de type gène pour gène peut rapidement conduire au contournement de la résistance par les agents pathogènes. Parallèlement, plusieurs auteurs ont suggéré que les résistances quantitatives pourraient être plus durables que les résistances qualitatives (Parlevliet 2002, Brun et al. 2010, Palloix et al. 2009). Palloix et al. (2009) avancent deux hypothèses pour expliquer la plus grande durabilité des résistances quantitatives : (1) par rapport à la résistance monogénique, dans le cas de la résistance polygénique, pour devenir virulent, un agent pathogène doit combiner un plus grand nombre de mutations dans son génome; (2) les pressions de sélection exercées sur l'agent pathogène par la résistance quantitative seraient réparties entre les différents gènes et seraient plus faibles que celles dues à la résistance qualitative, ce qui permettrait de réduire le risque d'émergence de mutants virulents dans la population (Boite 6). Par ailleurs, les variétés contenant des résistances quantitatives entraineraient une augmentation du temps de latence des agents pathogènes, une diminution de l'efficacité d'infection ainsi qu'une réduction du nombre de spores produits (Pariaud *et al.* 2009). Même si la résistance quantitative n'entraine pas de cycles de « boom and bust », l'adaptation des populations d'agents pathogènes peut conduire à une érosion de la résistance quantitative. Un modèle théorique d'interaction hôte-parasite montre en effet que la résistance quantitative des hôtes peut conduire à une augmentation de l'agressivité chez l'agent pathogène (Gandon et Michalakis 2000). La sélection d'isolats plus agressifs par les hôtes partiellement résistants par rapport aux hôtes sensibles a ainsi été rapportée dans plusieurs pathosystèmes : blé/ Mycosphaerrella graminicola (Cowger et Mundt 2002), pomme de terre / P. infestans (Montarry et al. 2006, Andrivon et al. 2007), hévéa / Microcyclus ulei (Le Guen et al. 2007).

(ii) Coûts associés à l'évolution de la virulence. La durabilité de la résistance dépend du nombre de mutations associées à la virulence (Ayme *et al.* 2007) et du coût associé à ces mutations (Leach *et al.* 2001). En effet, certaines études montrent que le passage de l'avirulence à la virulence a un coût sur la fitness de l'agent pathogène (Thrall et Burdon 2003, Huang *et al.* 2006, Caffier *et al.* 2010, Montarry *et al.* 2010). Ce coût associé à la virulence a été trouvé dans un certain nombre d'études, mais il y a d'autres exemples où l'évolution de la virulence ne semble pas se traduire par un coût associé (pour une revue voir Leach *et al.* 2001). De plus, un modèle développé par Janzac et al. (2009) prédit que la durabilité de la résistance va dépendre du mode d'interaction (directe ou indirecte) entre les gènes de résistance de la plante et les gènes de virulence de l'agent pathogène. L'utilisation de

gènes de résistance induisant un coût de la virulence important chez le pathogène est également une stratégie intéressante pour augmenter la durabilité des résistances. Dans le cas de l'interaction entre *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et le riz, le coût de fitness sur l'agent pathogène a été évalué au champ pour trois gènes de résistance introgressés dans des lignées quasi-isogéniques : *Xa4, Xa7* et *Xa10* (Vera Cruz *et al.* 2000).

Une diminution de l'agressivité de l'agent pathogène a été observée sur la lignée Xa7 en comparaison avec les autres lignées (Xa4 et Xa10). De plus, les souches virulentes sur la lignée Xa7 ne se développent pas l'année suivante et ne se maintiennent donc pas dans les populations naturelles. Le gène Xa7 est donc efficace et durable au champ, car la mutation de ce gène vers la virulence impose un coût important (Vera Cruz et al. 2000). De même, dans le cas de l'interaction entre P. infestans et la pomme de terre, 132 isolats ont été évalués pour leur capacité à se développer sur 11 variétés de pomme de terre contenant les gènes de résistance R1 à R11. Le gène R10 impose un coût de la virulence sur P. infestans lié à une diminution de la production de spores (Montarry et al. 2010). La connaissance approfondie des déterminants de la résistance peut contribuer à sélectionner des résistances qui soient plus durables sur la base du coût associé à la virulence. Ainsi, il est possible, non pas de sélectionner n'importe quel facteur de résistance, mais de cibler les gènes du pathogène qui, si ils sont mutés/perdus, conduisent à sa mort. Avec la disponibilité des séquences de génomes complets, l'établissement de catalogues d'effecteurs et leur clonage dans des vecteurs d'expression se démocratisent. A partir de là, les approches combinant la génétique des populations et l'effectoromique permettent de retenir les effecteurs les plus conservés du pathogène (Bart et al. 2012) et d'étudier leur spécificité vis à vis des résistances identifiées chez la plante (Vleeshouwers et al. 2011).

(iii) Le potentiel adaptatif du pathogène. L'analyse de la structure génétique des populations (distribution de la diversité génétique à l'intérieur et entre les populations) permet d'évaluer de manière indirecte le potentiel évolutif des pathogènes (McDonald et Linde 2002) qui est gouverné par cinq forces évolutives. (a) La mutation permet l'apparition de nouveaux allèles dans les populations, ce qui augmente la probabilité d'obtenir de nouvelle virulence.
(b) La dérive génétique qui se produit dans les populations d'effectif limité, conduit à la disparition de certains allèles dans la population. Maintenir des populations de petite taille permet de réduire la vitesse d'adaptation de l'agent pathogène à l'hôte. (c) La migration conduit à des flux de gènes à des échelles plus ou moins importantes en fonction de la capacité de dispersion de l'agent pathogène. La migration a pour conséquence d'une part

d'augmenter la variabilité génétique dans les populations à partir de laquelle la sélection effectue son tri, et d'autre part, de permettre la dispersion de combinaisons alléliques favorables. (d) La reproduction mixte (alternance de la reproduction sexuée et asexuée) accélère l'adaptation des agents pathogènes : les combinaisons alléliques favorables sont générées par la reproduction sexuée, sélectionnées par la plante-hôte, et amplifiées au cours des cycles de reproduction asexuée. (e) La sélection naturelle permet l'augmentation en fréquence des individus d'une population possédant une mutation favorable (virulence). Au final, les agents pathogènes présentant le plus grand risque de contournement des gènes de résistance sont ceux qui ont des taux de mutations élevés, un système de reproduction mixte et des flux géniques élevés (migration/taille efficace) (McDonald and Linde 2002).

(iv) Stratégies de déploiement des résistances. Désormais, dans le cas non pas d'une seule mais de plusieurs résistances disponibles, il est indispensable de savoir comment les utiliser dans le temps et l'espace. La question de la stratégie de gestion des résistances est en effet cruciale car les modèles théoriques montrent que la façon dont elles sont déployées a un impact direct sur leur durabilité (McDonald et Linde 2002, Sapoukhina *et al.* 2009).

Une stratégie 'minimum' consiste à déployer un gène R, à le maintenir jusqu'à ce qu'il soit contourné puis à le remplacer par un autre. Mais il est également possible d'alterner le déploiement des résistances, en réalisant par exemple une rotation de deux gènes d'une année sur l'autre. Une troisième stratégie consiste à créer une mosaïque spatiale de résistance via l'utilisation d'associations variétales. L'une des associations variétales les plus connues concerne la résistance à la pyriculariose du riz. La culture en association de variétés de riz gluant, de haute valeur gustative mais très sensibles à la pyriculariose, avec des variétés hybrides résistantes a été testée à une large échelle en Chine (Zhu et al. 2000). L'association a permis d'éliminer les traitements à partir de la seconde année d'expérimentation. La sévérité de la maladie a également été diminuée, en passant de 20% en culture monovariétale à 1% en associations (Zhu et al. 2000). Par ailleurs, un modèle mathématique a montré, dans le cas des virus, que les stratégies optimales de déploiement de la résistance, «en mélange» (où des cultivars sensibles et résistants coexistent) ou « pures » (avec seulement des cultivars résistants), dépendent des caractéristiques de la résistance et du contexte épidémiologique (incidence de l'épidémie et connectivité du paysage) (Fabre et al. 2012). La dernière stratégie consiste à cumuler plusieurs gènes de résistance dans un génotype de plante. Deux études, l'une chez un virus et l'autre chez un champignon, ont montré que l'association de résistances quantitatives à un gène de résistance R permet d'empêcher l'apparition d'isolats virulents (Palloix *et al.* 2009, Brun *et al.* 2010). Dans le cas de l'interaction entre le virus Y de la pomme de terre (PVY) et le piment, le gène *Pvr2* est rapidement contourné lorsqu'il est introgressé dans une variété sensible alors qu'il reste efficace dans la variété présentant une résistance partielle (Palloix *et al.* 2009). Dans le cas de l'interaction entre *Leptosphaeria maculans* et le colza, le gène *Rlm6* était contourné après 3 ans de culture lorsqu'il était introgressé dans une variété sensible alors qu'il reste efficace après 5 ans de culture dans une variété avec une résistance quantitative (Brun *et al.* 2010). Ces deux études montrent donc l'importance du fond génétique dans lequel les résistances sont introgressées. Cette stratégie qui s'avère durable pourrait être compromise par les programmes de sélection donnant la priorité aux gènes de résistance qualitative (Palloix *et al.* 2009) en favorisant la sélection de mutants conduisant donc à l'inefficacité et l'inutilité du pyramidage.

## L'interaction Vitis spp. / Plasmopara viticola

#### Phylogéographie et histoire de la vigne

La vigne cultivée (*Vitis vinifera*) est issue d'une longue domestication qui a commencé il y a plusieurs milliers d'années. Des fouilles archéologiques suggèrent que les premières traces de ceps et de preuves de fabrication de vin datent de plus de 7000 ans dans la région de la Géorgie (McGovern *et al.* 1996). A partir de cette région du Caucase, la vigne se serait ensuite étendue au sud ouest du croissant fertile jusqu'à rejoindre l'Egypte où des fresques datant de plus de 5000 ans représentant des procédés de vinification ont été découvertes ainsi que des amphores contenant du vin (Myles *et al.* 2011). Ensuite, la vigne a été cultivée par les grecques qui commencèrent alors le commerce du vin il y a plus de 4000 ans et implantèrent la vigne dans l'ensemble du bassin méditerranéen (Johnson 1990). Les romains poursuivirent le développement de la viticulture et répandirent sa culture dans toute l'Europe occidentale. Les procédés de vinification furent ensuite améliorés en France et les premiers vignobles français se développèrent il y a 2000 ans, notamment dans le bordelais. D'autres vignobles sont ensuite rapidement implantés en Bourgogne, Vallée de la Loire et Alsace. C'est à partir du XIIème siècle que la consommation de vin se généralise à toute la France.

La Vigne est une plante Angiosperme appartenant à l'ordre des Rhamnales et à la famille des Vitacées. Cette famille compte 19 genres parmi lesquels se trouve le genre *Vitis* qui, lui-même se divise en deux sous-genres : *Muscadinia* et *Euvitis*. Le sous-genre *Muscadinia* comprend

trois espèces diploïdes (2n=40) : *muncinia, popenoei* et *rotundifolia*. Le sous-genre *Euvitis*, qui signifie « vigne vraie », comprend plus de 70 espèces sauvages diploïdes (2n=38) classées en quatre groupes en fonction de leur origine géographique (Galet 2000). Les vignes américaines regroupent une trentaine d'espèces telles que *V. labrusca, V. aestivalis, V. riparia, V. cinerea, V. rupestris, M. rotundifolia* dont la plupart présentent un bon niveau de résistance aux pathogènes (Bush et Meissner 1883). Les vignes asiatiques regroupent également une trentaine d'espèces telles que *V. amurensis, V. coignetiae, V. flexuosa, V. davidii, V. jacquemontii*. Les vignes tropicales regroupent une dizaine d'espèces moins communes telles que *V. peninsularis, V. balansana*. La Vigne européenne ne comprend qu'une unique espèce *Vitis vinifera ssp. sylvestris* qui a été domestiquée en ne sélectionnant que les plantes hermaphrodites donnant naissance à la vigne cultivée moderne, *Vitis vinifera ssp. sativa*. Les études phylogénétiques du genre *Vitis* supportent les groupes identifiés en fonction de la géographique et confirme la parenté entre la vigne européenne (*Vitis vinifera*) et les groupes des espèces asiatiques (Figure 3) (Zecca *et al.* 2012).



Figure 3 : Phylogénie et distribution géographique des vignes appartenant au genre *Vitis*. (Extrait de Zecca et al. 2012)

#### Le mildiou de la vigne

#### Systématique

Berk. & M.A. Curtis ont décrit le mildiou de la vigne sous le nom de *Botrytis viticola*. Celuici a, par la suite, été renommé *Peronospora viticola* par De Bary (1863). De Bary indique que le mildiou est présent sur *V. aestivalis* Michiganesis *et V. labrusca* L. *foliis* en Amérique boréale au mois d'août et de manière plus abondante en septembre. L'agent du mildiou de la vigne est nommé aujourd'hui sous le nom de *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berlese & De Toni (1888).

*P. viticola* est un parasite obligatoire appartenant à la classe des oomycètes. De part leurs similarités morphologiques, physiologiques et écologiques avec les champignons, les oomycètes étaient traditionnellement traités avec la mycologie. Cependant, les données biochimiques, ultrastructurales et moléculaires confirment qu'ils constituent un groupe très éloigné des champignons appelé Straménopiles qui inclut également les algues brunes et les diatomées (Leipe *et al.* 1994). Néanmoins, les oomycètes et les champignons phytopathogènes présentent des modes de parasitisme des plantes similaires, suggérant une convergence évolutive (Tyler 2002).

Les oomycètes forment un groupe très diversifié d'organismes eucaryotes dont la majorité sont des parasites de plantes (60%) (Thines *et al.* 2010). Le parasitisme des plantes aurait évolué au moins trois fois indépendamment dans différentes lignées des oomycètes : une fois au sein des Saprolégniales comprenant *Aphanomyces euteiches* et deux fois au sein des Péronosporales avec les « downy mildew » (*Plasmopara, Bremia, Peronospora*, etc.) et les *Albugo* (Figure 4).



Distribution Figure 4: de la pathogénicité végétale et animale au sein des oomvcètes (extrait de Jiang et Tyler 2012). Les cas d'évolution de la pathogénicité et la biotrophie obligatoire sont indiqués par les étoiles rouges. Les agents pathogènes avec des séquences du génome entier sont indiqués en rouge. Les dégradés de couleurs indiquent généralement une spécialisation des pathogènes aux plantes (vert) ou aux animaux (orange).

#### Cycle de développement

P. viticola est un oomycète diploïde hétérothallique (Wong et al. 2001) nécessitant pour sa reproduction sexuée deux gamètes issus de thalles de polarités différentes qui ne sont pas distinguables morphologiquement. Le cycle biologique de P. viticola est présenté en figure 5. Plusieurs générations asexuées se succèdent pendant la saison de développement de la vigne suivi d'une génération sexuée à l'automne. A ce moment de la phase sexuée, des oospores se forment au sein des feuilles par fécondation entre un spermatocyste et une oogone. Au printemps, l'infection primaire commence par la germination des oospores et la production des sporanges sous l'effet de l'humidité et de la chaleur qui vont libérer à leur tour des zoospores dans l'eau et vont ainsi infecter les tissus de la vigne. Les zoospores s'enkystent rapidement, émettent un tube germinatif qui pénètre dans les tissus via les stomates et forment la vésicule sous-stomatique. Puis des haustoria se forment au contact des cellules de l'hôte d'où seront émis des hyphes extracellulaires. Après quelques jours d'incubation, une coloration dite en « tache d'huile » apparait sur la face supérieure des feuilles. Finalement, l'émission par les stomates de sporangiophores portant les sporanges se produit. Cette sporulation forme un feutrage blanc sur la face inférieure de la feuille. L'infection secondaire commence alors par la libération des sporanges qui a lieu par temps humide. Les zoospores sont libérés des sporanges et vont infectés des tissus encore indemnes. A la fin de l'été, la diminution de la température et de la photopériode favorisent la formation d'oospores : la forme de résistance du pathogène.



Figure 5 : Cycle de développement de *P. viticola* sur la vigne avec une phase sexuée et une asexuée.



**Diversité des symptômes sur différents organes végétatifs infectés par le mildiou de la vigne** : (a) feuille de *Vitis aestivalis* infectée, (b) vrille de Chancellor infectée, (c) nécrose sur la face supérieure d'une feuille de *Vitis aestivalis*, (d) sporulation et nécroses sur la face inférieure d'une feuille de *Vitis vinifera*, (e) sporulation sur une fructification de Chancellor, (f) faces interne et externe d'une feuille de *Vitis labrusca* (Niagara) infectée.



**Exemples de la diversité des vignes cultivées et sauvages présentent dans le Nord-Est américain** : (a) Chancellor, (b) Vitis riparia, (c) Vitis labrusca, (d) Vitis vinifera, (e) Vitis aestivalis, (f) Parthenocissus quinquefolia.

Jusqu'à récemment, il était postulé que les épidémies étaient liées à l'amplification clonale d'un nombre restreint de génotypes au début de saison suivi d'une migration à longue distance des propagules asexuées (Blaeser et Weltzien 1979, Lafon et Clerjeau 1988). Grâce à l'utilisation de quatre marqueurs microsatellites, Gobbin *et al.* (2005, 2007) ont récemment réévalué la contribution de la reproduction sexuée (infection primaire par les oospores) et asexuée (infections secondaires) aux épidémies de mildiou. Ces auteurs ont constaté que les épidémies de mildiou résultent de l'infection de nombreux génotypes différents, une observation qui montre que la reproduction sexuée contribue fortement aux épidémies. Ces auteurs ont également évalué la dispersion des génotypes clonaux au vignoble et ont montré que les génotypes se dispersent majoritairement à faible distance (échelle de la parcelle). En revanche, on ne dispose toujours d'aucune donnée sur la queue de dispersion des propagules de mildiou de la vigne, notamment en fin de saison quand la prévalence de la maladie augmente en raison de l'arrêt des traitements fongicides.

#### Le mildiou dans son bassin d'origine et son invasion en Europe

Dans son bassin d'origine, le Nord-Est des Etats-Unis, le mildiou de la vigne est présent sur plusieurs espèces sauvages du genre *Vitis* spp. . Des analyses phylogénétiques de quatre gènes montrent que *P. viticola* comprend quatre lignées évolutives monophylétiques indépendantes évoluant sans flux de gènes (espèces cryptiques). De plus, les isolats de *P. viticola* collectés à partir des mêmes plantes-hôtes, mais dans différents lieux géographiques sont génétiquement plus proches que les isolats prélevés sur des espèces hôtes différentes dans la même parcelle. La forte association entre les lignées et les plantes-hôtes suggère un rôle important de la spécialisation dans l'origine et le maintien des espèces de *P. viticola* (Rouxel *et al.* 2012b).

En 1881, Millardet indique que l'époque de l'importation du mildiou de la vigne en Europe n'est pas connue mais qu'il n'y avait jamais été décrit avant le 1<sup>er</sup> septembre 1878 dans les vignobles de Bordeaux. Il mentionne également que dans les années qui suivirent, le mildiou se propagea à travers l'Europe. Il a été montré que la variabilité mitochondriale en Europe est faible (2 haplotypes), suggérant qu'une toute petite population d'isolats est à l'origine de l'introduction du mildiou en Europe (Chen *et al.* 2007). Plus récemment, l'histoire de l'invasion du mildiou en Europe et dans le reste du nouveau monde viticole (Australie, Asie, Afrique du Sud, Nord-Ouest des Etats-Unis) a été réévaluée à l'aide de données génétiques. La structure génétique d'isolats collectés dans la région d'origine du mildiou (Nord-Est américain) et dans les régions d'introduction de l'agent pathogène (Europe, Australie, Asie, Afrique du Sud, Nord-Ouest américain) montre qu'une seule espèce de mildiou a été
introduite en Europe et que ce continent a servi de tête de pont pour l'introduction de l'agent pathogène dans les vignobles du nouveau monde viticole (Delmotte *et al.* données non publiées). L'étude de la structure génétique du mildiou en Europe montre que les populations possèdent une faible diversité génétique, ce qui montre l'existence d'un fort goulet d'étranglement au moment de l'introduction du pathogène à la fin du XIX<sup>eme</sup> siècle. Les analyses révèlent l'existence de deux groupes géographiquement (Ouest-Est) et génétiquement distincts. Des analyses d'ABC (Approximate Bayesian Computation) indiquent une vague de colonisation du mildiou à partir de l'Ouest vers l'Est du vignoble européen. (Delmotte *et al.* soumis).

#### L'amélioration variétale de la vigne pour la résistance au mildiou

En 1881, Alexis Millardet rapporte « Tandis qu'aux Etats-Unis, le mildiou est seulement plus ou moins dangereux pour les vignes indigènes, il est mortel pour les vignes européennes » (Millardet 1881). Il indique également que les américains « connaissent le mildiou de temps immémorial » (Millardet 1881). En effet, les Américains avaient étudié avec soin l'influence du mildiou sur leurs différents cépages et savaient qu'en général *V. labrusca* et *V. aestivalis* sont relativement sujets à cette maladie tandis que *V. riparia* l'est beaucoup moins (Bush et Meissner 1883). Si tous les cultivars de *V. vinifera* sont sensibles au mildiou, la résistance doit donc être introduite à partir des *Vitis* résistants ou d'hybrides introgressés à travers un programme d'amélioration qui garantisse le maintien des caractéristiques agronomiques et oenologiques désirables.

La résistance des *Vitis* spp au mildiou a fait l'objet de plusieurs études (Staudt et Kassemeyer 1995, Cadle-Davidson *et al.* 2008, Jurges *et al.* 2009). Le développement de *P. viticola* a été étudié sur un panel de *Vitis* spp. originaires d'Amérique du Nord, d'Asie et d'Europe. Deux types de réponse peuvent être mises en place suite à l'infection par *P. viticola* en fonction de l'espèce hôte sauvage. Une inhibition est observée sur les espèces nord américaines, et des développements aberrants sont observés sur les espèces asiatiques. Ces résultats indiquent que le mode d'interaction entre *P. viticola* et les espèces de *Vitis* dépend des espèces hôtes (Jürges *et al.* 2009). De même, Cadle-Davidson *et al.* (2008) ont mis en évidence des contradictions entre les résultats d'études menées par différents laboratoires concernant la résistance au mildiou de certaines accessions de vigne. Le fait que ces études aient utilisé des isolats

différents, suggère que certaines résistances peuvent ne pas être efficaces contre tous les isolats de *P. viticola*.

Les connaissances sur le déterminisme génétique des sources de résistance au mildiou progressent (Tableau 1). Des QTLs (de l'anglais Quantitative Trait Lci) de résistance ont été identifiés parmi des espèces sauvages américaines, *Muscadinia rotundifolia* et *V. riparia*, et asiatiques, *V. amurensis*. Ils ont également été identifiés au sein d'espèces cultivées commercialisées pour leur résistance au mildiou (hybrides entre *V. vinifera* et des variétés résistantes sauvages) : Regent, Bianca, Solaris, Bronner, Rondo. Parmi les QTL identifiés, certains induisent une résistance partielle comme *Rpv1* et *Rpv3*, et d'autre une résistance totale comme *Rpv2* et *Rpv8* (Tableau 1).

Un premier cas de contournement de résistance de la vigne par une souche européenne de *P. viticola* a été observé vis à vis du QTL *Rpv3*. En effet, il a été montré qu'un isolat collecté sur la variété Bianca possède le même comportement sur la variété résistante Bianca que sur des variétés sensibles sans coût de fitness (Figure 6) (Peressotti *et al.* 2010).

**Tableau 1 : Liste des QTL décrits comme impliqués dans la résistance contre le mildiou de la vigne.** Sont indiqués : le nom du QTL, le pourcentage du phénotype expliqué par la présence du QTL, le chromosome sur lequel il a été identifié, et les références bibliographiques correspondantes.

QTL	% phénotype	Chromosome	Identifiés dans	Références
Rpv1		12	Muscadinia rotundifolia	Merdinoglu <i>et al.</i> 2003
Rpv2	/	18	M. rotundifolia	Wiedmann-Merdinoglu <i>et al.</i> 2006, Bellin <i>et a</i> l. 2010
Rpv3	37.30%	18	Regent, Bianca	Welter <i>et al</i> . 2007, Moreira <i>et al</i> . 2011, Schwander <i>et al</i> . 2012
Rpv4	9-22.6%	4	Regent	Welter <i>et al</i> . 2007
Rpv5	26-34.4%	9	Gloire de montpellier ( <i>V. riparia</i> )	Marguerit <i>et al.</i> 2009
Rpv6	28.9-31.5%	12	V. riparia	Marguerit <i>et al</i> . 2009, Moreira <i>et al.</i> 2011
Rpv7	3.8-12.1%	7	Bianca	Bellin <i>et al.</i> 2009
Rpv8	86.30%	14	V. amurensis	Blasi et al. 2011
Rpv9	6.7-17%	7	V. riparia	Moreira <i>et al</i> . 2011
Rpv10	50%	9	Solaris, Rondo and Bronner (V. amurensis)	Blasi et al. 2010, Schwander et al. 2012
				Fisher et al. 2004, Bellin et al. 2009,
Rpv11	3.40%	5	Regent, Chardonnay, Solaris	Schwander et al. 2012
Rpv12	/	/	V. amurensis	Di Gaspero, in preparation
Rpv13	7.5-21.2%	12	V. riparia	Moreira <i>et al</i> . 2011



**Figure 6 : Contournement de résistance du QTL de Bianca par l'isolat SL** (extrait de Peressotti *et al*, 2010). SL a été collecté sur la variété résistante Bianca (R), SC et SU ont été collectés sur Chardonnay, variété sensible (S)

# IV- Objectifs de la thèse

Une piste prometteuse pour limiter l'utilisation des intrants phytosanitaires en viticulture consiste à modifier le matériel végétal afin de créer des systèmes viticoles qui utilisent la résistance variétale. Si le socle des connaissances sur le déterminisme génétique des résistances de la vigne est aujourd'hui solide, notre compréhension du fonctionnement et de l'évolution des populations du pathogène est très insuffisante. Cette situation ne permet pas d'anticiper les conséquences liées à l'introduction de la résistance dans les systèmes viticoles, et en particulier, de garantir leur durabilité face aux populations du pathogène. L'acquisition et l'intégration de nouvelles connaissances sur les bases génétiques de l'interaction entre *P. viticola* et la vigne sont donc un enjeu majeur de la recherche. **Dans ce contexte, l'objectif général de ma thèse est d'étudier l'écologie et l'évolution de l'interaction entre** *P. viticola* **et la vigne et de comprendre les mécanismes d'adaptation du mildiou à sa plante-hôte.** 

Durant ma thèse, j'ai abordé cette problématique à différentes échelles évolutives : (i) une échelle macroévolutive avec l'étude de la (co-)évolution du mildiou sur les différentes espèces de *Vitis* dans son aire d'origine, (ii) une échelle microévolutive avec le suivi de l'évolution des populations de mildiou face aux résistances variétales. Les questions auxquelles j'ai répondu sont les suivantes :

- Quel est le niveau de spécialisation du pathogène sur ses hôtes sauvages et cultivés ? La diversité génétique de l'agent pathogène dans son aire d'origine est-elle structurée par la plante-hôte ?
- Les populations de *P. viticola* s'adaptent-elles aux résistances de la vigne en Europe ?
   L'utilisation de variétés résistantes de vigne induit-elle des modifications de virulence et d'agressivité des populations de mildiou ?
- Quelles sont les bases moléculaires impliquées dans la spécialisation du pathogène et dans l'adaptation du mildiou face aux résistances de la vigne ?

L'adaptation du mildiou aux différentes espèces de *Vitis*, l'adaptation du mildiou aux gènes de résistance et l'identification des gènes impliqués dans ces processus sont les axes qui constituent le fil conducteur de mes travaux de thèse.

- Introduction générale -

Dpéciation et spécialisation plante-hôte du mildiou de la vigne dans son aire géographique d'origine

4

1

- Chapitre 1 : Spéciation et spécialisation plante-hôte du mildiou de la vigne dans son aire géographique d'origine -

# Préambule

Dans son bassin d'origine, en Amérique du Nord, le mildiou est en interaction avec un grand nombre d'espèces de *Vitis* sauvages avec lesquelles il a co-évolué. Des analyses antérieures à ma thèse sur la diversité génétique du mildiou en Amérique du Nord avaient apporté les preuves de l'existence d'un complexe d'au moins quatre espèces cryptiques au sein des populations de mildiou de la vigne. Les données obtenues laissaient penser que certaines de ces espèces pourraient être spécifiques à des espèces de *Vitis* sauvages ou cutivées. Dans ce contexte, un de mes objectifs de thèse a été de comprendre s'il existait une spécialisation du mildiou à ses plantes-hôtes. Pour répondre à cette question, plusieurs études complémentaires ont été effectuées. Ce sont les résultats de ces travaux qui sont présentés dans ce premier chapitre qui s'articule en 2 parties :

## 1 - Spécialisation plante-hôte des espèces cryptiques de P. viticola

Au cours de ce travail, j'ai caractérisé le niveau de spécialisation des différentes espèces cryptiques de *P. viticola* sur les différentes espèces de *Vitis* par le biais d'inoculations croisées, et étudié les différences morphologiques entre les différentes espèces de mildiou. Les résultats obtenus ont été couplés aux résultats phylogénétiques précédemment réalisés pour être présentés dans le manuscrit intitulé : *Phylogenetic and experimental evidence for host-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete*, accepté pour publication dans la revue *New Phytologist* (Annexe 1). Dans ce manuscrit, j'ai réalisé les tests d'inoculations croisées ainsi que l'analyse des données obtenues concernant la spécialisation et les données morphologiques. J'ai également contribué à l'analyse des données génétiques (arbre des espèces).

Dans un second temps, j'ai étudié la distribution des espèces cryptiques de mildiou sur les *Vitis* spp. du Nord-Est américain. Dans cette partie, nous cherchons à décrire la distribution des espèces de *P. viticola* sur les espèces de *Vitis* sauvages et cultivées du Nord-Est américain. Cette étude repose sur l'analyse moléculaire (ITS) de la collection de notre laboratoire de plus de 2500 isolats de *P. viticola* qui résultent de quatre campagnes d'échantillonnages ayant eu lieu entre 2007 et 2010 et auxquelles j'ai contribué en 2009. Une partie des isolats nous a aussi été envoyé grâce à plusieurs collaborations.

# 2 - Structure génétique au sein des espèces cryptiques de P. viticola

En vue d'évaluer les barrières aux flux de gènes au sein des espèces cryptiques de mildiou en fonction des plante-hôtes, j'ai développé un ensemble de marqueurs microsatellites. Avant mon arrivée au laboratoire, une banque d'ADNc enrichie en marqueurs microsatellites avait été produite dans laquelle un certain nombre de loci microsatellites avait été identifié. Afin de poursuivre l'identification de marqueurs microsatellites chez le mildou de la vigne, j'ai réalisé une recherche *in silico* de motifs microsatellites dans des ressources génomiques de *P. viticola* qui étaient disponibles au laboratoire. Après tri des loci identifiés, j'ai dessiné et testé des amorces puis j'ai effectué les tests de polymorphisme de l'ensemble des loci (anciennement et nouvellement identifiés) sur 95 isolats européens et américains. Les résultats de ce travail sont présentés dans le manuscrit intitulé *Microsatellite markers for the characterization of native and introduced populations of Plasmopara viticola, the causal agent of grapevine downy mildew* qui a été accepté dans la revue *Applied and Environnemental Microbiology* (Annexe 2).

Grâce au développement de ces marqueurs microsatellites, j'ai étudié la structuration génétique des espèces B et C qui présentent une large gamme d'hôtes sauvages et cultivés. En particulier, nous nous sommes demandés si la sélection par la plante-hôte pouvait conduire à l'existence de barrières aux flux de gènes entre les populations au sein des espèces cryptiques de mildiou de la vigne.

# 1.1. Spécialisation plante-hôte des espèces cryptiques de Plasmopara viticola

# 1.1.1 Phylogenetic and experimental evidence for host-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete

# Introduction

Host shift speciation has been shown to be responsible for plant parasites diversification (Refregier et al., 2008; Tellier A., 2010). Host-plants and their parasites exhibit intimate physiological interactions, which lead to the evolution of host-specific adaptations following host shifts. Some life-history traits and specificities in the life cycles of plant pathogens may facilitate rapid ecological divergence by reducing the constraints that usually impair speciation. Indeed, the production of numerous propagules, the linkage of traits experiencing selection, together with the strong selection imposed by the hosts and gene exchange occurring within hosts are key factors that strongly favour ecological speciation (Giraud et al., 2010). Within-host mating and selection is especially important in biotrophic plant pathogens that strictly depend on the plant to survive and that undergo sexual reproduction on the hostplant. In this case, mutations providing adaptation to a new host pleiotropically affect mating patterns, providing one of the most favourable scenarios for ecological speciation (Gavrilets, 2004). The rapid ecological divergence experienced by plant pathogens implies that many of them may in fact be complexes of sibling species, an idea put forward by Crous and Groenewald (Crous & Groenewald, 2005): "Show me a plant pathogen, and I will show you a species complex". Since then, there has been abundant phylogenetic evidence supporting the view that many current names of well-known plant pathogens actually mask complexes of cryptic species (O'Donnell et al., 2000; Steenkamp et al., 2002; Fournier et al., 2005; Le Gac et al., 2007; Garcia-Blazquez et al., 2008; Choi et al., 2011). In addition to the divergent selective pressures caused by specialization on the host, plant pathogens also evolved in response to agro-ecosystem. Cultivated crops indeed represent large naïve targets for pathogens shifting from wild hosts. Genetic and environmental uniformity coupled with vast plantation of cultivated plants is expected to favour more aggressive pathogens (Anderson & May, 1982; Stukenbrock & McDonald, 2008). Confirming this hypothesis, evidences for an increase in agressiveness resulting from domestication have been documented for the main pathogens of rice (Couch et al., 2005), apple (Lê Van et al., 2012), or wheat (Stukenbrock et al., 2011).

The pathosystem Vitis - Plasmopara viticola is a prime candidate for studying host specialization in biotrophic plant pathogens. The modern grapevine originated from the domestication of a unique Eurasian species (V. vinifera L.) (Zecca et al., 2012). It has been cultivated since ancient times, with the earliest evidence for winemaking dating back to 7400-7000 BP (before present) in the Caucasian area (McGovern et al., 1996). The history of viticulture parallels the development of western civilisations, and its cultural significance persists today in centuries-old viticultural countries. From the middle of the 19<sup>th</sup> century, viticulture has been threatened by grapevine downy mildew, a disease that was introduced in Europe from Northern America (Millardet, 1881). Grapevine downy mildew, caused by the obligate biotrophic oomycete P. viticola, is considered one of the most destructive grapevine diseases worldwide (Viennot-Bourgin, 1949). Grapevine (V. vinifera) cultivars are highly susceptible to the disease and currently require an intense chemical management program to control the disease. In Northeastern America, the native range of P. viticola, the Vitaceae family present a higher diversity than in Europe. Therefore, P. viticola has been described on several Vitis species in the Vitaceae: in addition to V. vinifera, it has been found on other cultivated grapes - Vitis labrusca L. (fox grape), as well as on wild grapes such as V. riparia Michx. (river bank grape), V. aestivalis Michx. (summer grape), and Virginia creeper (Parthenocissus quinquefolia L. Planch) (Bush & Meissner, 1883).

Several studies have addressed the question of host-plant specialization in the interaction between *P. viticola* and the Vitaceae. First, several decades ago Savulescu and Savulescu (Savulescu & Savulescu, 1951) and Golovina (Golovina, 1955) independently proposed the existence of different specialized forms of *P. viticola* on the Vitaceae based on morphology of spores; however, as for many plant pathogens, morphological characteristics alone are too variable and/or simple to allow clear species delineation, and these specialized forms of the pathogen could never be further confirmed. Second, comparison of disease resistance screens of *Vitis* germplasm performed in different laboratories with different isolates showed lack of concordance between the different studies (Cadle-Davidson, 2008); this observation could, in part, be explained by the occurrence of race-specific isolates in *P. viticola*, in particular for resistant cultivars and advanced breeding lines. Third, the genetic analysis of 14 *P. viticola* isolates, including 9 North-American isolates, led Schröder *et al.* (2011) to propose the existence of several genetic lineages in grapevine downy mildew; however, due to the limited sampling of this study the results were not conclusive on the status of the lineages described, thus making it difficult to assess the association between the pathogens and their host-plants.

A more comprehensive study is therefore required to address the existence of specialized cryptic species in grapevine downy mildew.

Different criteria have been employed to recognize species: typological which emphasizes morphological divergence, biological (Mayr, 1942) emphasizing reproductive isolation or phylogenetic based on genetic divergence. Due to the biotrophic nature of *P. viticola*, crossing strains of this pathogen and obtaining viable progenies is very challenging, as it requires cumbersome and time-consuming bioassays (Scherer & Gisi, 2006; Gisi *et al.*, 2007). This clearly impedes the use of biological procedures for recognizing species in grapevine downy mildew. Taylor *et al.* (2000) advocated the use of analysing multiple genes as a criterion to identify phylogenetic species within fungal pathogens and introduced the term genealogical concordance phylogenetic species recognition (GCPSR). GCPSR uses the phylogenetic concordance of multiple unlinked genes to indicate a lack of genetic exchanges and thus, evolutionary independence of lineages. This approach has proved to be the most convenient for fungal species delimitation because it is more finely discriminating than the other criteria, and also because it is applicable to fungal species that cannot be cultivated or mate in control conditions (O'Donnell *et al.*, 2000; Steenkamp *et al.*, 2002; Pringle *et al.*, 2005; Le Gac *et al.*, 2007; Giraud *et al.*, 2008; Henk *et al.*, 2011).

In the present study, we have addressed the existence of host-plant specialized species in grapevine downy mildew by combining a phylogenetic approach based on concordance of multiple genealogies, analyses on sporangia morphology and controlled cross-inoculation experiments. We collected downy mildew samples on three wild species (*P. quinquefolia, V. riparia, V. aestivalis*) and several cultivated varieties (*V. labrusca* cv. Niagara and Concord, *V. vinifera*, interspecific hybrids) in the states of Michigan, Ohio, New York and Virginia (USA). We analysed the polymorphism at four different nuclear loci (*actin, tubulin, internal transcribed spacer* and *nrLSU*) of these isolates and assessed their pathogenicity and aggressiveness by cross-inoculating a subset of isolates on six host plants. This allowed us to address the following specific questions: (i) Are there genetically isolated lineages within *P. viticola* that have not been distinguished based on morphological criteria? (ii) What is the level of morphological divergence among *P. viticola* collected on different hosts? (iii) Are *P. viticola* isolates able to infect a single host species or a broad range of *Vitis* spp.? (iv) Has the expansion from wild to cultivated hosts modified the life history traits of the pathogen (pathogenicity, aggressiveness)?

#### Materials and methods

# Background

*Plasmopara viticola* ([Berk. & M.A. Curtis] Berl. & De Toni) is a heterothallic diploid oomycete (Oomycota, Stramenopiles) that undergoes several asexual generations during the grape growing season and one sexual cycle in autumn. In spring, oospores resulting from sexual reproduction germinate and release zoospores that give rise to primary infections. Under favourable weather conditions, asexual reproduction leads to secondary infection through the production of sporangia containing zoospores that spread to the leaves and berries by splashing rain or wind. In this study, each sample of *P. viticola* collected from the field consisted of 1 cm<sup>2</sup> of a fresh leaf colonized by sporulating downy mildew.

# Plant material

Six host plants were used for the inoculation experiments: *V. vinifera* cv. Chardonnay (Double A vineyard nursery, Fredonia, NY), *V. riparia* Michx. (Cold Stream Farm nursery, Free Soil, MI), *P. quinquefolia* L. Planch. (growing wild in Lansing, MI), *V. aestivalis* (accession REM59-77; USDA-ARS Plant Genetic Resources Unit, Geneva, NY), *V. labrusca* cv. Niagara (Double A vineyard nursery, Fredonia, NY) and Chancellor (Seibel 7053) (Double A vineyard nursery, Fredonia, NY). Plants were grown in a growth chamber at 25°C, with a photoperiod, 16h : 8h, light : dark.

# P. viticola sampling and collection

Downy mildew isolates were collected from naturally infected cultivated and wild grapes (*V. labrusca, V. vinifera, V. riparia, V. aestivalis, Vitis* interspecific hybrids) as well as from virginia creeper (*P. quinquefolia*) in Michigan, Ohio, New York and Virginia.

*Isolates for phylogenetic study.* Downy mildew samples were collected from geographically separated locations for a given host plant. A total of 114 isolates were sampled in 18 locations on three wild species (*P. quinquefolia*, *V. riparia*, *V. aestivalis*) and cultivated varieties (*V. labrusca*, *V. vinifera*, Hybrids) (Fig. 1, Table S1).

*Live isolates*. A collection of live isolates derived from natural infection of *P. viticola* was established. A first set of live isolates consisted of four bulk samples created by pooling the spores of several sporulating lesions collected in different locations but on the same hostplant. These bulk samples were made from isolates collected on *V. vinifera* (bulkVIN), *V. labrusca* (bulkLAB), *V. riparia* (bulkRIP) and *P. quinquefolia* (bulkPAR). In addition, 19 isolates were established from individual infected leaves from *V. aestivalis* (n = 2), *V. vinifera* (n = 5), *V. labrusca* (n = 4), *V. riparia* (n = 4) and Chancellor (n = 4) collected at different locations (Fig. 1, Table S2). All the isolates were genetically characterized using the four nuclear markers described in the genetic characterization section.



Fig. 1: Geographical origin and source host plants of *Plasmopara viticola* isolates. A detailed description of the samples is presented in Tables S1 and S2.

# Genetic characterization and phylogenetic analysis

*DNA extraction*. Oil spots were freeze-dried overnight, and DNA was extracted from each of them according to the standard cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB), phenol-chloroform method described in Delmotte *et al.* (2006) and Chen *et al.* (2007).

DNA amplification and sequencing. Four different gene regions were selected for molecular characterization. Specific primers were designed for the internal transcribed spacer region 1 (ITS), a fragment of the 28S gene of the ribosomal RNA (28S), a fragment of the gene encoding  $\beta$ -tubulin (TUB) and a fragment of the actin gene (ACT) (Table S3). PCR reactions were carried out in a final volume of 15 µl containing 1µl of 1:3 dilution of genomic DNA, 2 mM MgCl2, 150 µM of each dNTP, 4 pmol of each primer and 0.3 U Taq Silverstar DNA polymerase in reaction buffer. Thermocycling conditions were as follows: 95°C for 4min, 40 cycles of 95°C for 40sec, 58°C for 45sec, 72°C for 90sec, followed by 72°C for 10min. Sequencing of PCR amplicons was outsourced at Genoscope, the French National Sequencing Center (Evry, France).

Sequence assembly and allele inference. Forward and reverse sequences were imported into CodonCode Aligner (v. 2.0.6, Codon Code Corporation), assembled into contigs, and visually checked for errors. All the polymorphic sites were confirmed by manual examination of the

electropherogram. For sequences that presented heterozygote sites, gametic phase estimation was performed using the ELB algorithm implemented into Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Using this method, we have determined for each isolate the two alleles at each of the four loci (Table S1). Aligned sequences for each gene region and for the concatenated dataset were analysed in DnaSP v. 4.00.6 (Rozas *et al.*, 2003) for nucleotide polymorphisms.

The sequences of the alleles obtained have been deposited in GenBank: ITS hap1-4 (JF897779-JF897782), 28S hap1-8 (JF897848-JF897855), ß-tubulin hap1-32 (JF897816-JF897847), actin hap1-32 (JF897783-JF897815).

*Phylogenetic analyses.* Data from each genomic region were first analyzed alone, and then all regions were combined in a single analysis (concatenated dataset). The different sets of alleles were aligned using Muscle implemented in Seaview (Gouy *et al.*, 2010). Phylogenetic relationships among alleles (and individual samples) were inferred using maximum-likelihood (ML) methods implemented in PhyML (Guindon & Gascuel, 2003) and maximum-parsimony (MP) implemented in PAUP (Swofford, 1993). Maximum-parsimony genealogies were constructed using the heuristic search function with 1000 random addition replicates and tree bisection and reconstruction (TBR) using a branch swapping algorithm. Gaps were treated as fifth characters and all characters were unordered and of equal weight. Insertions/deletions (indels), irrespective of their size were each treated as one evolutionary event and weighted as one base substitution. To estimate branch support, bootstrap values were determined using 1000 bootstrap replicates for MP and ML.

The best-fit models of nucleotide substitution were selected using MODELTEST v. 3.06 (Posada & Crandall, 1998) based on likelihood scores for 88 different models and the AIC criterion. *Phytophthora sojae* was used as an outgroup for the phylogenetic analyses.

Species tree analyses. A species tree inference approach was used to resolve the relationship among the lineages identified. We estimated the species tree of *P. viticola* using Bayesian methods under the \*BEAST v1.7.3 software package (Drummond *et al.*, 2012). A single tree was reconstructed from the four independent loci (ITS, 28S, ACT, TUB), implementing the recommended substitution models for each locus as obtained from MODELTEST. All samples with sequence data for every locus were used. A Yule speciation process was specified as it is the most appropriate when comparing relationship between species. We ran MCMC chains for 10 million generations, sampling trees every 1000 generations and using strict molecular clock. We used Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond, 2007) to asses likelihood stabilisation and convergence for BEAST analyses, and discarded the first 10% of trees as burn-in. *Polymorphism, recombination, differentiation.* For each lineage, standard population genetic analyses were performed on samples presenting distinct genotypes (combination of alleles) at a given location. This was done to avoid a misleading interpretation resulting from the clonal amplication of isolates that can occur in one geographical site (field). We calculated the number of segregating sites, the number of alleles, haplotypic diversity and  $\pi$ , the average number of nucleotide differences between pairs of sequences (Nei, 1987), the number of parsimony informative site, and the Tajima's D using the program DnaSP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003). Divergence among lineages was estimated in DnaSP as the average pairwise number of nucleotide differences per site, D<sub>xy</sub> (Tajima, 1983). Differentiation between lineages was also tested using the statistics  $K_{\rm ST}^*$  (Hudson *et al.*, 1992).

### **Cross-inoculation experiments**

For each *Vitis* spp., the fourth and fifth youngest leaves from growing shoots were collected, rinsed with sterile water and dried. Leaf discs were excised, bulked and distributed abaxial face up over Petri dishes covered by wet filter paper. Inoculum of downy mildew isolates was prepared as described hereafter: infected leaves from the field were rinsed with water and placed in a growth chamber overnight in order to obtain new sporulation. Sporangia on the surface were collected, resuspended in sterile water and kept in ice. Sporangia concentration of each sample was measured using a haemocytometer and inocula were diluted to obtain a final concentration of 20,000 spores/mL. Inoculations were performed by placing a 20 µl drop of inoculum on the center of abaxial face of each leaf disc, i.e. approximately 400 spores per drop. After incubation overnight in the dark at 21°C, leaf drops were dried. Petri dishes were sealed and incubated at 21°C, with a photoperiod, 16h : 8h, light : dark.

In a first experiment, the four bulk samples of isolates (bulkVIN, bulkLAB, bulkRIP, bulkPAR) were inoculated on *V. vinifera* (cv. Chardonnay), *V. labrusca* (cv. Niagara), *V. riparia* and *P. quinquefolia*, leading to 16 host-pathogen interactions. Each interaction consisted of 21 leaf discs distributed in three circular 90 mm Petri dishes.

In a second experiment, 19 isolates collected on five source hosts (*V. vinifera, V. labrusca, V. riparia, V. aestivalis* and Chancellor) were inoculated on the same five host-plants. A total of 95 host-pathogen interactions, each replicated seven times, were assessed. This consisted of 665 leaf discs placed in seven 23 cm square dishes, each one including the 95 combinations of the experiment.

For both experiments, leaf discs were observed from 3 to 7 days post inoculation (dpi) and scored for the presence of sporulation and necrosis (hypersensitive reaction of the plant). For the second experiment, sporulation of each leaf disc was quantified using the Scepter 2.0<sup>TM</sup>

automated cell counter (Millipore). The cell size range used for counting sporangia was 8-25  $\mu$ m.

Quantitative data were analysed by non parametric analysis of variance (Kruskal Wallis test) followed by post hoc pairwise Wilcoxon tests for comparisons among isolates grouped by lineages and source host-plant. Isolates coming from the same source host-plant and belonging to the same lineage were considered as random effect in the analysis. Therefore, data from these isolates were pooled resulting in six groups of isolates: CHA (lineage A), RIP (lineage A), AES (lineage B), LAB (lineage B), VIN (lineage B), VIN (lineage C). Statistical tests were performed using R software.

# Morphological diversity

Sporangia size was assessed directly from natural infection collected in the field as well as from infection resulting from cross-inoculations. For field samples, forty samples were chosen among the isolates collected for the phylogenetic study. Plant tissue samples were stored in a fixative solution until analysis. Ten sporangia per isolate were measured under the microscope using a stage micrometer. For samples derived from the controlled inoculation, we assessed the morphology of sporangia from each leaf discs that exhibited sporulation. The size of sporangia was measured using the automated cell counter as described in the cross – inoculation experiments section. Data were analyzed using a non-parametric analysis of variance implemented in R software.

#### Results

#### Phylogenetic analysis

Sequences were obtained from 112 *P. viticola* isolates for ITS, 113 for 28S, 107 for ACT, and 103 for TUB (Table S1). All isolates for which a sequence was obtained revealed to be homozygous for ITS, while for ACT, TUB and 28S, heterozygous sites were detected. Gametic phase estimation was performed for these three gene regions and the two alleles present at each locus were reconstructed for each sample (Table S1).

We obtained four alleles for ITS (ITS1-ITS4), nine for 28S (LS1-LS9), 33 for ACT (ACT1-ACT33) and 33 for TUB (TUB1-TUB33). For coding regions (ACT, TUB), all variable sites identified resulted from synonymous substitutions. A summary of the polymorphism and diversity of each gene region is presented in Table 1. Globally, the most polymorphic gene region was TUB ( $\pi = 0.053907$ ) and the least polymorphic was 28S ( $\pi = 0.010547$ ). A total of four indels of one nucleotide were found to be located in the ITS (n = 3) and 28S (n = 1). The number of parsimony informative sites (excluding gaps) was 2, 13, 42 and 72 for ITS, 28S,

ACT and TUB, respectively. Once concatenated, the four regions resulted in a dataset showing 161 polymorphic sites and 129 parsimony informative sites.

MODELTEST indicated that the best model for the data was the General Time Reversible (GTR) model for each of the four gene regions. The phylogenies obtained from sequence data of the gene regions were first determined separately. Main relationships among the alleles were topologically identical in the maximum-parsimony and in the maximum likelihood (ML) consensus trees; therefore, we chose to show the ML tree with bootstrap values given for the well-supported branches with both methods (Fig. 2).

Taxon	locus	n <sup>a</sup>	bp <sup>b</sup>	S <sup>c</sup>	$n_A{}^d$	Pi <sub>A</sub> <sup>e</sup>	$h_d^{f}$	$\pi^{\mathrm{g}}$	$D^h$
All spec	cies								
	ITS	50	238	15	4	2	0.699	0.0197	-
	28S	60	702	20	8	13	0.775	0.0105	-
	ACT	88	455	52	33	42	0.941	0.0350	-
	TUB	70	519	79	32	72	0.953	0.0539	-
А									
	ITS	22	231	0	1	0	-	-	-
	28S	22	701	0	1	0	-	-	-
	ACT	44	455	21	13	15	0.827	0.0136	0.920
	TUB	22	519	9	11	6	0.827	0.0049	0.139
В									
	ITS	12	231	0	1	0	-	-	-
	28S	17	702	1	2	0	0.382	0.0005	0.566
	ACT	16	455	8	6	5	0.683	0.0072	0.739
	TUB	22	519	18	10	8	0.853	0.0074	-0.808
С									
	ITS	12	233	0	1	0	-	-	-
	28S	15	702	1	2	0	0.248	0.0003	-0.399
	ACT	24	455	15	13	7	0.935	0.0087	-0.043
	TUB	22	519	22	9	9	0.840	0.0075	-1.31
D									
	ITS	4	233	0	1	0	-	-	-
	28S	6	702	3	3	0	0.733	0.0020	0.338
	ACT	4	455	0	1	0	-	-	-
	TUB	4	519	1	2	0	0.667	0.0013	1.63

**Table 1**: Global polymorphism of the nucleotidic alignments of *P. viticola* sequences for the four genomic regions analysed.

The dataset analysed here was constructed by removing multicopy alleles within populations.

<sup>a</sup> sample size (n)

<sup>b</sup> total number of sites (bp) <sup>c</sup> number of segregating sites (S)

<sup>d</sup> number of alleles  $(n_A)$ 

<sup>e</sup> number of parsimony informative site between alleles ( $Pi_{A}$ )

<sup>f</sup> haplotypic (allelic) diversity (h<sub>d</sub>)

<sup>g</sup> average number of difference per sites ( $\pi$ )

<sup>h</sup> Tajima's D (D)

For each gene tree, four monophyletic lineages (A, B, C and D), including each the same isolates, were well supported (Fig. S1, Table S1, Fig. 2). All pairwise comparisons of differentiation between *P. viticola* lineages measured by  $K_{ST}$  were significant at  $P < 10^{-3}$  (Table S4). In the *tubulin* tree only, additional groups were supported within lineages B and C, but they did not correspond to any biological characteristics. All trees (ML, MP) generated with the different gene regions and the concatenated dataset produced congruent topologies, i.e. for a given isolate, the corresponding alleles obtained by sequencing the four genes were always assigned to the same lineage (Table S1, Fig. 2, Fig S1).



**Fig. 2**: Maximum likelihood reconstruction of alleles relationships using partial *actin* (ACT), *tubulin* (TUB), *internal transcribed spacer* (ITS) and *nrLSU* (28S) sequences. Stars on alleles indicate their prevalence in the dataset: no star < 5,  $* \ge 5$ ,  $** \ge 10$ . Bootstrap values are given when superior to 70% for both the maximum likelihood and parsimony analysis. The four *P. viticola* lineages identified are labelled on the trees (A, B, C, D). Host plant of origin for each allele is indicated with a shaded box next to the allele (legend for shaded boxes is shown in the inset).

While our data brought evidence that each of the four lineages are monophyletic in each locus, the gene trees showed differing relationships between the four recognized lineages. The concatenated tree (Fig. S1) and the species tree (Fig. 3) inferred from the multilocus dataset recovered the same interspecific relationships: lineages C and D are the most closely related taxon and lineage A is the more divergent taxon. This is further confirmed by our results on fixed polymorphism and on the average number of nucleotide differences per site (Table S4). It is worth noting that the phylogenetic relationships between lineages reconstructed in the concatenated dataset are mainly driven by *tubulin* phylogenetic signal. The small number of fossil records on oomycetes and their complete absence for downy mildews rendered impossible the calibration of the trees and the estimation of the time scale for the diversification of the lineages.



**Fig. 3**: Contatenated and species trees of *Plasmopara viticola* formae speciales (a) Maximumlikelihood tree of alleles obtained by concatenating *actin* (ACT), *tubulin* (TUB), *internal transcribed spacer* (ITS) and *nrLSU* (28S) partial sequences. Branches bootstrap values are given for both the maximum likelihood and parsimony analyses. (b) Species tree topology recovered from the \*BEAST analysis based on the same four loci. Posterior probabilities of branches are given in the tree. Leaf pictures indicated source host plants for each *P. viticola* formae speciales (<sup>§</sup>: cultivated hosts).

The lineages were strongly associated to the host plant collected (Fig. 2, 3; Table 2): lineage A corresponded to isolates collected on *V. riparia* (n = 53) and on hybrid Chancellor, and three isolates from other hybrids. Lineage B corresponded to isolates collected on *V. labrusca* and *V. aestivalis*, two isolates collected on *V. vinifera*, and three isolates from hybrids. Lineage C included 11 isolates collected on *V. vinifera* and six isolates collected on three interspecific hybrids. Lineage D included the 3 isolates collected on *P. quinquefolia*. Except for samples collected on hybrids, samples collected from the same host-plant species but in

different geographic regions were genetically more similar than samples collected on different host species in the same fields (Table S1). Within *P. viticola* lineages collected on several host plants (A, B), no alleles were found to be associated to a given *Vitis* species, ruling out the existence of substructure driven by host-plants within pathogen lineages.

Heat along	Variates	P. viticola lineages					
nost-plant	variety	Α	В	С	D		
Vitis riparia							
-	wild grape	29					
	rootstock	1					
Vitis aestivalis							
	wild grape		6				
Vitis labrusca							
	Niagara		24				
	Concord		2				
Vitis vinifera							
·	Chardonnay		1	1			
	Gamay			2			
	Gewurtztraminer			1			
	Pinot Noir		1	2			
	Riesling			4			
	Syrah			1			
P. quinquefolia	!						
	wild vine				3		
Interspecific hy	brids						
1 0 1	Chancellor	24					
	NY-73.136			2			
	Table grape		2	1			
	Traminette			1			
	Vidal		1				
	Vignoles	1					
	unknown	2		2			

**Table 2**: Distribution of the *P. viticola* isolates following the host plant of origin and the phylogenetic lineages.

# Host specialization on Vitis spp.

We assessed the ability of the *P. viticola* isolates from different *Vitis* hosts to colonize leaf tissue (pathogenicity) of wild and cultivated *Vitis* spp. In a first experiment, four bulk samples of isolates sampled from different hosts were inoculated on *V. vinifera* cv. Chardonnay, *V. labrusca* cv. Niagara, *V. riparia* and *P. quinquefolia* (Table S2). All bulk samples of isolates from a given source plant were found to grow on their host-plant of origin. However, not all groups of isolates were able to infect all host plants (Fig. 4). BulkPAR was the only isolate able to infect *P. quinquefolia* leaves and was not able to colonize any other plants. Moreover, a hypersensitive response was observed when *P. quinquefolia* was inoculated with the isolates from other host plants. Similarly, bulkRIP was able to infect *V. riparia* but could not colonize leaf tissues of other host plants. Remarkably, bulkRIP induced a strong hypersensitive response on *V. vinifera* that produced numerous necrotic spots (Fig. 4a). Finally, bulkLAB and bulkVIN were able to infect all host plants except *P. quinquefolia*. Molecular characterization of isolates constituting the bulk samples revealed that isolates from bulkRIP

belonged to lineage A, isolates from bulkPAR belonged to lineage D and isolates from bulkVIN and bulkLAB belonged to lineage B (Table S2).



**Fig. 4**: Host specialization in the interaction between *Plasmopara viticola* and the Vitaceae. (a) Pathogenicity of *P. viticola* isolates on different plant hosts. Leaf discs from different Vitaceae species inoculated with bulks of isolates for each source host plant (bulkPAR: *P. quinquefolia*, bulkRIP: *V. riparia*, bulkLAB: *V. labrusca*, bulkVIN: *V. vinifera*). Pictures are representative of results obtained for each combination host-isolate at 7 dpi. *V. labrusca* leaves presents white hairs and sporulation on *V. labrusca* was only found for bulkLAB and bulkVIN. (b) Sporulation of *P. viticola* isolates on different plant hosts. Each graphic represents a group of isolates based on their source host-plant (CHA: hybrid chancellor; RIP: *V. riparia*; AES: *V. aestivalis*, LAB: *V. labrusca*, VIN: *V. vinifera*) and lineages (A, B, C). Data show the mean value ( $\pm$  SEM) of the number of sporangia per group of isolates (n = number of isolates from each group multiplied by the number of replicates). Identical letters do not differ from each other at the significance level of P < 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) according to a Kruskal Wallis test followed by a post-hoc pairwise Wilcoxon test.

These results prompted us to perform a second experiment using individual isolates from the different groups and addressing the possible quantitative differences in growth between isolates and/or interactions. *P. quinquefolia* and its derived isolates were not used for this experiment because of the strong specificity of the interaction observed in the previous experiment. Nineteen isolates were characterized at the four molecular markers and assigned to *P. viticola* lineages. We used 4 isolates from *V. riparia* (RIP) and 4 from Chancellor (CHA) all belonging to lineage A; 2 isolates from *V. aestivalis* (AES) and 4 from *V. labrusca* (LAB), all from lineage B; and 5 isolates from *V. vinifera* (VIN), 3 from lineage B and 2 from lineage C (Fig. 1, Table S2).

Isolates were inoculated on all source host plants. Results obtained with individual isolates confirmed the results of the previous experiment. Isolates collected on *V. riparia* or Chancellor (RIP, CHA) were able to infect *V. riparia* and Chancellor but never grew on leaf tissues of other host plants (except a very limited production of spores on *V. aestivalis* with necrosis) and induced a hypersensitive response in *V. vinifera*. Also, isolates B and C (VIN, LAB) were able to infect all host plants. However, B isolates from *V. aestivalis* (AES) were not able to infect *V. vinifera* and *V. labrusca* in our experiment. This result has to be taken with caution since it was difficult to obtain sporulation with isolates from *V. aestivalis* even when inoculated on their own host plant. A summary of qualitative results from both experiments is presented in Table 3.

**Table 3**: Pathogenicity of *P. viticola* isolates from six Vitaceae source host plants inoculated on the same six host plants. The table summarizes the results of two independent cross inoculation experiments.

Source host	P. viticola	Inoculated host plants								
plants	lineages	V. riparia	Chancellor	V. aestivalis	V. labrusca	V. vinifera	P. quinquefolia			
V. riparia	А	$+_{\delta}$	+	$+_{\delta}$	-	-8	-8			
Chancellor	А	+	+	$+^{\$}$	-	_\$	-8			
V. aestivalis	В	$+_{\delta}$	+	$+_{\delta}$	-	-8	-8			
V. labrusca	В	+	+	+§	+	+	_\$			
V. vinifera	В	+	+	$+^{\$}$	+	+	-8			
V. vinifera	С	+	+	+§	+	+	_\$			
P. quinquefolia	D	-8	-		-	-	$+_{\delta}$			

Quantitative analysis revealed an interesting variability in sporulation of isolates of different source hosts when inoculated on the five host-plants (Fig. 4b, Fig. S2). For a given group of isolates (same source host plant and lineage of *P. viticola*), we found significant effects of

inoculated host-plants on the sporulation and conversely (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance,  $P < 10^{-3}$ ), for a given inoculated host plant we found a significant effect of the isolate group on the sporulation (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance,  $P < 10^{-2}$ ). CHA, LAB and VIN isolates, which were able to infect several host-plants in the experiment, were more aggressive on their source host-plant than on other host-plants (Fig. 4b).

Interestingly, we observed that sporulation of downy mildew isolates when inoculated on their host plant of origin was lower for wild species (*V. aestivalis* and *V. riparia*) than for cultivated hosts (Chancellor, *V. labrusca*, *V. vinifera*) (Fig. S2).

We compared, on one hand, sporulation of lineage A isolates (RIP, CHA) on *V. riparia* (wild) and Chancellor (cultivated) and on the other hand, sporulation of lineage B isolates (AES, VIN, LAB), on *V. aestivalis* (wild), *V. vinifera*, and *V. labrusca* (cultivated). Isolates from cultivated hosts are significantly more aggressive on cultivated hosts than isolates from wild hosts. By contrast, no significant differences in aggressiveness between isolates were observed when inoculated on wild hosts (Fig. 5).



**Fig. 5**: Sporulation of *Plasmopara viticola* isolates from wild and cultivated source hosts interacting with their inoculated hosts. For lineage A isolates, the wild host is *V. riparia*, and the cultivated host is *Chancellor*. For lineage B isolates, the wild host is *V. aestivalis*, and cultivated hosts are *V. vinifera* and *V. labrusca*. Data shows the mean value ( $\pm$  SEM) of the sporangia number (n = number of isolates from each interaction multiplied by the number of replicates). Data were tested using a Kruskal Wallis test: \*\* *P* < 0.05; \*\*\* *P* < 0.01.

#### Morphological analysis

We found that sporangial size differed significantly among the four phylogenetic lineages of *P. viticola*. Lineage D isolates were significantly smaller than all others. Lineage A and lineage C isolates were not different in size. Isolates from lineage B were found intermediate between A/C and D (Fig. 6a). To rule out the possibility that the differences in sporangial size were caused by the host plant, and not intrinsic to the isolate group, we measured the size of sporangia from cross-inoculation experiments. As shown in Figure 6b, the size differences between different isolate groups were independent from the inoculated host-plant. It is worth noting that sporangia sizes assessed with the cell counter were different from those measured under microscope. This is because cell counter estimate the sporangia size by modelling a symmetric particle while microscope inspection allows measuring the actual morphology of sporangia.

By combining phylogenetic and experimental results, we have proposed a most likely scenario for host range expansion of *P. viticola* lineages from wild to cultivated species (Fig. 7).



**Fig. 6:** Morphological analysis of sporangia of *Plasmopara viticola* isolates. (a) Samples derived from natural infections. Average ( $\pm$  SEM) length and width ( $\mu$ m) of sporangia of grapevine downy mildew samples assessed under the microscope using a stage micrometer. Samples are grouped by lineages (A, B, C, D). (b) Live isolates derived from the cross-inoculation experiment. Sporangia size ( $\mu$ m) was assessed using an automated cell counter. Isolates are grouped by source host-plants (CHA: hybrid chancellor; RIP: *V. riparia*; AES: *V. aestivalis*, LAB: *V. labrusca*, VIN: *V. vinifera*) and by lineages (A, B, C, D). The title of each graphic indicates the inoculated plant. A mean size was calculated for each leaf disc. Bars indicate the mean size value ( $\pm$  SEM) from seven replicates (seven leaf discs) of all isolates of each group: 28 values for CHA (lineage A), 28 for RIP (lineage A), 14 for AES (lineage B), 28 for LAB (lineage B), 21 for VIN (lineage B), and 14 for VIN (lineage C). Identical letters do not differ from each other at the significance level of P < 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) according to a Kruskal Wallis test followed by a post-hoc pairwise Wilcoxon test.

#### Discussion

# Evidence for several host-specific independent cryptic species of P. viticola

Here we presented several lines of evidence leading us to propose that grapevine downy mildew is not caused by a single species but rather by a complex of cryptic species that have radiated on the Vitaceae. Applying the genealogical concordance phylogenetic species recognition criterion (Taylor et al., 2000) provided evidence that P. viticola includes four independent evolutionary lineages evolving without gene flow and showing molecular divergences that might reflect distinct species. Although some of the genes presented low phylogenetic signal (ITS, 28S), the four monophyletic lineages are well supported by independent gene genealogies, the concatenated dataset and the species tree. Isolates of P. viticola collected from the same host plants but in different geographic locations were genetically closer than isolates collected on different host species in the same field. The strong association between lineages and host-plants suggests a major role of specialization in the origin and maintenance of the P. viticola lineages, a hypothesis supported by crosspathogenicity tests. Two of these lineages are highly specific to their host (lineages A, D on V. riparia and P. quinquefolia respectively), while lineages B and C grown on multiple hosts and have an optimal aggressiveness on V. labrusca and V. vinifera respectively. Finally, morphological analysis further supported the existence of the phylogenetic lineages: we observed differences of sporangial size between lineages that were independent of the host plant inoculated, indicating that this result was not due to phenotypic plasticity of the pathogen but rather that differences in sporangia size are genetically determined.

Therefore, *P. viticola*, an apparently well-known and widespread plant-pathogen, actually hides several host-specific cryptic species that could be considered as formae speciales: *P. viticola* f. sp. *riparia* (lineage A occurring on *V. riparia* and some hybrids), *P. viticola* f. sp. *aestivalis* (lineage B found on *V. aestivalis*, *V. labrusca* and *V. vinifera* and some hybrids), *P. viticola* f. sp. *viticola* f. s

The results presented here are congruent with a previous phylogenetic study on *P. viticola*. Schröder *et al.* (2011) reported significant diversity among North American *P. viticola* isolates, giving a first hint to potential species boundaries in this species. Since one of the markers used was shared with our study (*nrLSU*), we could establish that the lineages identified by Schröder *et al.* (2011) correspond to three of the cryptic species we have

described here. However, the small number of isolates analysed by Schröder *et al.* (2011) prevented these authors from reaching any conclusion concerning host specialization.

# Ecological specialization is promoting the evolution of cryptic species of P. viticola

Among oomycetes, biotrophic groups such as downy mildews and albuginales are prime candidates for ecological speciation via host-specialization. Our results on grapevine downy mildew illustrate how biotrophic plant pathogens can diversify by host plant specialization. They are in agreement with phylogenetic studies that have recently reported the presence of distinct pathogen species on a specific host-plant family including *Albugo* and *Hyaloperonospora* on Brassicaceae (Goker *et al.*, 2009; Ploch *et al.*, 2010), *Bremia* on Asteraceae (Choi *et al.*, 2011), *Peronospora* on Fabaceae and on Lamiaceae (Garcia-Blazquez *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009; Thines *et al.*, 2009), *Peronosclerospora* on Poaceae (Telle *et al.*, 2011). Still the proximal mechanisms responsible for such adaptive radiation in downy mildews remain unknown. It has been proposed that the evolution of sibling oomycetes species may be driven by hybridization, as it has been observed for *Phytophthora* species (Brasier, 2000). However, we can discard recent hybridization in this system because the heterozygosity of *P. viticola* isolates was low within species, a result that does not fit with hybridization events.

While many studies have addressed host-plant specificity on downy mildews using phylogenetic approaches, very few have coupled it with an assessment of the specialization of the pathogens using cross-inoculation bioassays (Mitchell *et al.*, 2011; Runge & Thines, 2012). Yet, this is an important step towards understanding the interactions in a given pathosystem because inoculation tests bring substantial information on the actual pathogenicity and aggressiveness of a given isolate. In this study, results of the cross-inoculation experiments were mostly in agreement with the distribution of *P. viticola* cryptic species observed in natural grapevine downy mildew populations. Cryptic species A and D only infected respectively *V. riparia* and *P. quinquefolia*, and cryptic species B and C had an optimal development on *V. labrusca* and *V. vinifera*, respectively. The host range of cryptic species B and C appeared larger in controlled experiments than in natural infections: both colonized leaves of *V. riparia* and Chancellor in controlled conditions while we could never observe these cryptic species on these host plants in the field; similarly, cryptic species C could infect *V. aestivalis* and *V. labrusca* in the laboratory, which was never observed in the wild. This larger host range in laboratory could be explained by the optimisation of the

conditions used in bioassays: interactions are indeed favoured by the use of young leaves that are known to be more susceptible to the disease and by choosing the optimal temperature and hygrometry for the growth of the pathogen. By contrast, the combination of environmental and developmental factors in the field might affect eventual disease severity and could even lead plants to escape from infection.

#### Host range expansion and quantitative adaptation to cultivated hosts

P. viticola is endemic to North America where it has coevolved with wild Vitis spp. (Bush & Meissner, 1883). Although we lack reliable historical records, the host shift of downy mildew from wild to the cultivated grapes likely occurred during the 17<sup>th</sup> century with the development of viticulture by European colonists in America. The pathogen is now well established in vineyards where it over-seasons as oospores in the soil (Kennelly et al., 2007). Our data suggest that species A, that was found on the cultivated Chancellor hybrid, likely originated from V. riparia while species B, which infected V. vinifera and V. labrusca, may have originated from V. aestivalis. Colonization on novel hosts can be due to either host range expansion (the pathogen can still infect its host of origin) or host shifts (accompanied by a loss of the ability to infect the ancestral host). Here, we found that isolates collected on cultivated hosts all remained pathogenic on their ancestral (wild) hosts. Host range expansion from wild to cultivated hosts is usually associated to quantitative adaptation to the cultivated host, even in cases where ecological specialization is not found (Lê Van et al., 2012). In agreement with this hypothesis, the fitness of the isolates coming from cultivated varieties (CHA, VIN, LAB) was higher on their source hosts than on the other hosts. Several authors have previously reported quantitative adaptation to the cultivar of origin for several fungal plant diseases, including rice blast caused by Magnaporthae oryzae (Bonman et al., 1989), septoria tritici blotch caused by *Mycospaerella graminicola* (Ahmed *et al.*, 1996; Stukenbrock et al., 2011), potato late blight caused by Phytophthora infestans (Andrivon et al., 2007), apple scab caused by Venturia inaequalis (Lê Van et al., 2012), wheat leaf rust caused by Puccinia triticina (Pariaud et al., 2009).



**Fig. 7:** Hypothetical scenario for host range expansion of *Plasmopara viticola* formae speciales from wild to cultivated hosts.

#### Implications for viticulture

Beyond the necessary revision of the taxonomic status of *P. viticola*, the results presented here have important implications for breeding for resistance to grapevine downy mildew, disease management and also quarantine regulations.

First, our work highlights the importance of taking into account pathogen variability when screening germplasms for resistance to grapevine downy mildew. The differences reported by Cadle-Davidson (2008) in the identification of resistant sources between screens might result from an unrecognized structure of the pathogen such as the cryptic species described here or the use of virulent strains (Peressotti *et al.*, 2010; Calonnec *et al.*, 2012).

Second, the results obtained when confronting *V. vinifera* to *P. viticola* isolates derived from *V. riparia* should be taken into account for the construction of new resistant varieties. Indeed, while *V. vinifera* is highly susceptible to downy mildew, inoculation with *V. riparia*-derived isolates results in a strong necrosis, suggesting a resistant response from the plant. The *V. vinifera* genes responsible for this response should potentially be retained in the process of breeding for new varieties in order to make sure that the new varieties are resistant to *V. riparia*-derived isolates.

The unmasking of cryptic species means that some previous research on *P. viticola* will need to be revisited, because it was not clear which species were under study. Though challenging, it is also necessary to determine the agricultural importance of these newly revealed cryptic species of *P. viticola* by better assessing their spatio-temporal distribution during the course of the epidemics in vineyards. The accurate identification of plant pathogens is of particular importance to national biosecurity agencies, which have a mandate to prevent the introduction

of exotic pests and pathogens. In the case of grapevine downy mildew, phylogeographical studies are now required to compare native and introduced populations and to reconstruct the routes of invasion of the pathogen into Europe (Gobbin *et al.*, 2006; Rouxel *et al.*, 2012). Understanding invasive pathways and determining how many of the *P. viticola* cryptic species has established in Europe is crucial to assess the potential threat that introduction of new species represent for viticulture and to help defining new quarantine regulations.



CHA RIP AES LAB VIN VIN

# **Supplementary informations**

**Fig. S1:** Maximum likelihood trees of *Plasmopara viticola* isolates obtained with *actin* (ACT), *tubulin* (TUB), *internal transcribed spacer* (ITS) and *nrLSU* (28S) partial sequences. Bootstrap values are given when superior to 70%. The four *P. viticola* cryptic species identified are labelled on the trees (A, B, C, D).

D

С

Fig. S2: Aggressiveness of *P. viticola* isolates assessed from the cross-inoculation experiment. Each graphic shows results for the different isolates on a particular host plant. Data show mean value ( $\pm$  SEM) of the number of sporangia by isolates grouped following their source host-plant and lineages (A, B, C). Identical letters do not differ from each other at the significance level of *P* < 0,05 ( $\alpha$  = 5%) according to a Kruskal Wallis test followed by a post-hoc pairwise Wilcoxon test.

# **Table S1:** Detailed information (ID, site, host-plant, grapevine variety, organ, year of sampling and molecular profile at the four loci) on the 114 *Plasmopara viticola* isolates used for phylogenetic analysis.

ID	site	host-plant	cultivar	organ	year	IJ	rs <sup>a</sup>	28	s <sup>a</sup>	AC	Ta	TU	B <sup>a</sup>
		•		8		a1	a2	a1		a1	a2	a1	a?
277	Clarkovilla MI	Unbrid	Marquis	Loof	2000	2 [D]	2 [D]	5 [D]	6 [D]	2 [D]	2 [D]	10 [D]	10 [D]
277	Clarksville, MI	IIyond	Vieneles	Leaf	2000	2 [D]	2 [D]	5 [B] 1 [A]	1 [ 4 ]	2 [B]	2 [D]	19[0]	19 [0]
92	Clarksville, MI	Нурга	Vignoles	Lear	2007	3 [A]	3 [A]	I [A]	I [A]	na	na	28 [A]	28 [A]
/8	Clarksville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Lear	2007	2 [B]	2 [B]	2[B]	9 [B]	2 [B]	2[B]	19 [B]	19 [B]
79	Clarksville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
83	Clarksville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	18 [B]	18 [B]
84	Clarksville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	4 [B]	4 [B]	14 [B]	14 [B]
85	Clarksville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
86	Clarksville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	na	na	16 [B]	17 [B]
87	Clarksville, MI	Vitis vinifera	Chardonnay	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	na	na	16 [B]	17 [B]
280	Scottdale MI	Vitis labrusca	Concord	Leaf	1999	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
46	Dresden NY	Vitis rinaria	Riverbank grane	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	15 [A]	16 [A]	28 [A]	28 [A]
1110	Geneva NV	Hybrid	unknown	Leaf	2007	1 [C]	1 [C]	7 [C]	7[C]	9 [C]	12 [C]	20 [11] 7 [C]	0[C]
1140	Geneva, IVI Ganava, NV	Hybrid	unknown	Loof	2007	2 [ 4 ]	2 [ 4 ]	1[A]	1[A]	10 [A]	10 [ 4 ]	, [C]	)[C]
U40	Concern NV	D m in m C lin	Wincipia Concerns	Leaf	2007	J [A]		1 [A]		19 [A]	19 [A]	2 (D)	2 (D)
024	Geneva, NY	P. quinquefolia	Virginia Creeper	Lear	2007	4 [D]	4 [D]	3 [D]	4 [D]	6 [D]	6 [D]	2 [D]	2 [D]
025	Geneva, NY	P. quinquefolia	Virginia Creeper	Lear	2007	4 [D]	4 [D]	4 [D]	4 [D]	6 [D]	6 [D]	2 [D]	2 [D]
301	Onondaga, MI	Hybrid	Marquis	Leaf	2000	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	5 [B]	20 [B]	21 [B]
123	Lake Leelanau, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Tendril	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	26 [A]	26 [A]	28 [A]	32 [A]
124	Lake Leelanau, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	petiole	2007	na	na	1 [A]	1 [A]	26 [A]	26 [A]	28 [A]	32 [A]
128	Lake Leelanau, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	26 [A]	26 [A]	28 [A]	32 [A]
131	Lake Leelanau, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	na	na
133	Lake Leelanau, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	24 [A]	24 [A]	22 [A]	31 [A]
48	Lodi, NY	Hybrid	unknown	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	25 [A]	23 [A]
297	Lawton MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2000	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
150	Grass Lake MI	Vitis riparia	Rootstock	Stem	2008	3[4]	3 [ 4 ]	1 [A]	- [] 1 [Δ]	25 [4]	25 [4]	24 [A]	28 [4]
156	Grass Lake, MI	Vitis riparia	Riverbank grane	Leaf	2000	3 [ 1 ]	3[A]	1[A]	1[A]	18 [A]	18 [A]	24 [A]	24 [A]
220	Crass Lake, MI	Vitis riparia Vitis sinasia	Riverbank grape	Leaf	2008	2 [A]	2 [A]	1 [A]	1 [A]	16 [A]	10 [A]	24 [A]	24 [A]
220	Grass Lake, MI	vitis riparia	Riverbank grape	Lear	2008	3 [A]	3 [A]	I [A]	I [A]	16 [A]	21 [A]	na	na
159	Grass Lake, MI	Vitis vinifera	Chardonnay	Lear	2008	T[C]	T[C]	/ [C]	8 [C]	8 [C]	33 [C]	8 [C]	10 [C]
154	Grass Lake, MI	Vitis vinifera	Gamay	Leaf	2008	1 [C]	1[C]	7 [C]	7 [C]	7 [C]	33 [C]	4 [C]	8 [C]
155	Grass Lake, MI	Vitis vinifera	Gamay	Leaf	2008	1 [C]	1 [C]	7 [C]	7 [C]	11 [C]	33 [C]	4 [C]	8 [C]
164	Grass Lake, MI	Vitis vinifera	Gewurtztraminer	Leaf	2008	1 [C]	1 [C]	7 [C]	7 [C]	7 [C]	10 [C]	3 [C]	9 [C]
1	East Lansing, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Stem	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
2	East Lansing, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Stem	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	16 [A]	16 [A]	28 [A]	28 [A]
100	Traverse City, MI	Vitis vinifera	Pinot Noir	Leaf	2007	1 [C]	1 [C]	7 [C]	7 [C]	13 [C]	31 [C]	9 [C]	11 [C]
103	Traverse City, MI	Vitis vinifera	Pinot Noir	Leaf	2007	1 [C]	1 [C]	na	na	11 [C]	30 [C]	9 [C]	11 [C]
176	Howell, MI	Hvbrid	NY-73.136	Leaf	2008	1 [C]	1 [C]	7 [C]	8 [C]	27 [C]	27 [C]	9 [C]	9 [C]
177	Howell MI	Hybrid	NY-73 136	Leaf	2008	1 [C]	1 [C]	7 [C]	8 [C]	27 [C]	27 [C]	6 [C]	8 [C]
181	Howell MI	Hybrid	Traminette	Leaf	2008	1[C]	1[C]	7 [C]	7 [C]	28 [C]	28 [C]	6 [C]	9 [C]
102	Howell, MI	Hybrid	unknown	Loof	2000	1[C]	1[C]	7[C]	7[0]	20 [C]	20 [C]	6 [C]	9 [C]
170	Howell, MI	With a start	Disalina	Leaf	2008	1 [C]	1 [C]	7[0]	/ [C]	28 [C]	20 [C]	0[C]	0 [C]
1/9	Howell, MI	vitis vinijera	Riesling	Lear	2008	1[C]	T[C]	/ [C]	8 [C]	Π[C]	Π[C]	6 [C]	6 [C]
204	Howell, MI	Vitis vinifera	Syran	Lear	2008	T[C]	T[C]	/[C]	/[C]	na	na	6 [C]	8 [C]
59	Jackson, MI	Hybrid	Chancellor	Tendril	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	32 [A]
60	Jackson, MI	Hybrid	Chancellor	Tendril	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
61	Jackson, MI	Hybrid	Chancellor	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
62	Jackson, MI	Hybrid	Chancellor	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	16 [A]	16 [A]	28 [A]	28 [A]
63	Jackson, MI	Hybrid	Chancellor	Tendril	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	16 [A]	16 [A]	28 [A]	28 [A]
64	Jackson, MI	Hybrid	Chancellor	Petiolee	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	na	na	28 [A]	29 [A]
65	Jackson, MI	Hybrid	Chancellor	Stem	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	25 [A]	25 [A]	28 [A]	28 [A]
67	Jackson, MI	Hybrid	Chancellor	Berry	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	32 [A]
68	Jackson, MI	Hybrid	Chancellor	Tendrils	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	32 [A]
69	Jackson MI	Hybrid	Chancellor	netiolee	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	17 [A]	18 [A]	28 [A]	32 [A]
71	Jackson MI	Hybrid	Chancellor	Leaf	2007	3 [ 1 ]	3 [ 1 ]	1[A]	1[A]	1, [.1] na	no [ ]	27 [A]	28 [ 1 ]
72	Jackson, MI	Hybrid	Chancellor	Datialaa	2007	2 [A]	2 [ 4 ]	1[A]	1[A]	25 [ 4 ]	25 [ 1 1	27 [A]	20 [A]
72	Jackson, MI	IIyonu	Chancellor	T ettolee	2007	2 [A]	2 [A]	1 [A]	1 [A]	25 [A]	25 [A]	20 [A]	32 [A]
/3	Jackson, MI	Нубпа	Chancellor	Tendrii	2007	3 [A]	5 [A]	I [A]	I[A]	16 [A]	10 [A]	28 [A]	28 [A]
//	Jackson, MI	Hybrid	Chancellor	Stem	2007	3 [A]	3 [A]	I [A]	I[A]	23 [A]	23 [A]	28 [A]	28 [A]
284	Jackson, MI	Hybrid	Vidal	Leaf	2002	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	na	na	12 [B]	17 [B]
287	Lawton, MI	P. quinquefolia	Virginia Creeper	Leaf	2000	4 [D]	4 [D]	2 [D]	2 [D]	6 [D]	6 [D]	1 [D]	1 [D]
106	Suttons Bay, MI	Vitis vinifera	Riesling	Leaf	2007	na	na	7 [C]	7 [C]	10 [C]	11 [C]	8 [C]	8 [C]
119	Suttons Bay, MI	Vitis vinifera	Riesling	Leaf	2007	1 [C]	1 [C]	7 [C]	7 [C]	10 [C]	11 [C]	8 [C]	8 [C]
121	Suttons Bay, MI	Vitis vinifera	Riesling	Leaf	2007	1 [C]	1 [C]	7 [C]	7 [C]	na	na	8 [C]	8 [C]
136	Empire, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Stem	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
137	Empire, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Stem	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
138	Empire MI	Vitis rinaria	Riverbank grape	Berry	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	na	na
139	Empire MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Stem	2007	3 [ 4 ]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
140	Empire MI	Vitis riparia	Riverbank grupe	Stem	2007	na	- [''] na	1 [A]	1 [Δ]	18 [Δ]	18 [4]	28 [4]	28 [4]
1/1	Empire, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Patiolo	2007	3 [ 1 ]	3 [ 4 ]	1[A]	1 [ 4 ]	19 [A]	18 [ A ]	20 [7]	20 [71]
141	Donton Holton MI	r mo r ipar ia	Marguis	Loof	2007	J [A]	5 [A] 1 [C]	1 [A]		10 [A]	10 [A]	20 [A]	20 [A]
50	Enternon Harbor, MI	riyona Usha'l	rviarquis Chan II	Lear	2007	1[0]		/ [C]	0 [U]	12 [C]	29 [C]	5[0]	9[0]
3	rennville, MI	Hybrid	Chancellor	Leat	2007	5 [A]	3 [A]	I [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	29 [A]
4	Fennville, MI	Hybrid	Chancellor	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	I [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	29 [A]
5	Fennville, MI	Hybrid	Chancellor	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	14 [A]	14 [A]	28 [A]	28 [A]
6	Fennville, MI	Hybrid	Chancellor	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
7	Fennville, MI	Hybrid	Chancellor	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
8	Fennville, MI	Hybrid	Chancellor	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
29	Fennville, MI	Hybrid	Chancellor	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	na	na	20 [A]	20 [A]	28 [A]	28 [A]
31	Fennville, MI	Hybrid	Chancellor	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	20 [A]	20 [A]	na	na

32	Fennville, MI	Hybrid	Chancellor	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	20 [A]	20 [A]	na	na
252	Fennville, MI	Hybrid	Chancellor	Tendril	2008	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	na	na
259	Fennville, MI	Vitis aestivalis	Summer grape	Leaf	2008	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	1 [B]	32 [B]	15 [B]	15 [B]
260	Fennville, MI	Vitis aestivalis	Summer grape	Leaf	2008	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	1 [B]	3 [B]	na	na
263	Fennville, MI	Vitis aestivalis	Summer grape	Leaf	2008	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	1 [B]	3 [B]	17 [B]	13 [B]
264	Fennville, MI	Vitis aestivalis	Summer grape	Leaf	2008	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	1 [B]	32 [B]	15 [B]	15 [B]
281	Fennville, MI	Vitis aestivalis	Summer grape	Leaf	2000	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
282	Fennville, MI	Vitis aestivalis	Summer grape	Leaf	2000	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	na	na
247	Fennville, MI	Vitis labrusca	Concord	Leaf	2008	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
9	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
10	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
11	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	5 [B]	5 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
12	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
13	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
16	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
17	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
18	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
19	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	5 [B]	5 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
20	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
21	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
22	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
23	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	5 [B]	5 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
24	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
25	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
26	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
28	Fennville, MI	Vitis labrusca	Niagara	Leaf	2007	2 [B]	2 [B]	5 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
225	Fennville, MI	Vitis vinifera	Pinot noir	Leaf	2008	2 [B]	2 [B]	6 [B]	6 [B]	2 [B]	2 [B]	19 [B]	19 [B]
38	Fennville, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	23 [A]	28 [A]
39	Fennville, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Tendril	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
40	Fennville, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Tendril	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	26 [A]
44	Fennville, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	30 [A]
45	Fennville, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	30 [A]
46	Fennville, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	30 [A]
49	Fennville, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Tendril	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
50	Fennville, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Tendril	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	na	na	28 [A]	28 [A]
52	Fennville, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	23 [A]	28 [A]
53	Fennville, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Stem	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	28 [A]	28 [A]
54	Fennville, MI	Vitis riparia	Riverbank grape	Stem	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	22 [A]	22 [A]	28 [A]	29 [A]
U26	Valois, NY	Vitis riparia	Riverbank grape	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	na	na
U49	Valois, NY	Vitis riparia	Riverbank grape	Leaf	2007	3 [A]	3 [A]	1 [A]	1 [A]	18 [A]	18 [A]	na	na

<sup>1049</sup> Valois, NY *Vitis riparia* Riverbank grape Leaf 2007 3 [A] 3 [A] 1 [A] 1 [A] 1 [A] 18 [A] 18 [A] na na na <sup>a</sup> For each locus, we provide the allele combination using the allele numbering of Fig. 2 with the corresponding lineage (A, B, C, D) in brackets.

Isolate name	Source host plant	Sampling site	Lineage
bulkVIN	V. vinifera	Markko, OH	В
	V. vinifera	Markko, OH	В
	V. vinifera	Durgovich, OH	В
	V. vinifera	Durgovich, OH	В
bulkLAB	V. labrusca	Stones, OH	В
	V. labrusca	Stones, OH	В
	V. labrusca	Markko, OH	В
	V. labrusca	Fennville, MI	В
bulkRIP	V. riparia	Benton Harbor, MI	А
	V. riparia	Old Mission Peninsula, MI	А
	V. riparia	Lake leelanau, MI	А
	V. riparia	Traverse City, MI	А
bulkPAR	P. quinquefolia	Okemos, MI	D
	P. quinquefolia	Okemos, MI	D
	P. quinquefolia	Okemos, MI	D
	P. quinquefolia	Okemos, MI	D
VIN-2	V. vinifera	Traverse City,MI	С
VIN-3	V. vinifera	Jackson, MI	С
VIN-1	V. vinifera	Lowther, VA	В
VIN-4	V. vinifera	South River Vineyard, VA	В
VIN-5	V. vinifera	Benton Harbor, MI	В
CHA-1	Chancellor	East Lansing, MI	А
CHA-2	Chancellor	Traverse City,MI	А
CHA-3	Chancellor	Benton Harbor, MI	А
CHA-4	Chancellor	Fennville, MI	А
RIP-1	V. riparia	East Lansing, MI	А
RIP-2	V. riparia	Lawton, MI	А
RIP-3	V. riparia	Traverse City, MI	А
RIP-4	V. riparia	Fennville, MI	А
LAB-1	Concord	Clarksville, MI	В
LAB-2	Niagara	Clarksville, MI	В
LAB-3	Niagara	Lawton, MI	В
LAB-4	Concord	Benton Harbor, MI	В
AES-1	V. aestivalis	Lawton, MI	В
AES-2	V. aestivalis	Fennville, MI	В

**Table S2:** Detailed information (name, source host-plant, sampling site, and lineage) for Plasmopara viticola isolates used in cross-inoculation experiments.

Name	Primers	Gene name	Product size (bp)
ITS1-O ITS2	CGGAAGGATCATTACC GCTGCGTTCTTCATCGATGC	ITS1	278
NL1 NL4	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG GGTCCGTGTTTCAAGACGG	28S (LSU)	801
PVe04815-F PVe04815-R	GCTGACGAAGACGTTCAGG TGTAATCCGTCAGGTCACGA	actin a	565
PVc389-F3 PVc389-R4	CACTGTCGTTGAGCCCTACA AAACGTGGTGCTCATTTTCA	ß-tubulin	571

Table S3: Primers for the four genomic regions sequenced in Plasmopara viticola.

Table S4: Divergence between Plasmopara viticola phylogenetic lineages
--

Comparison	locus	Fixed <sup>a</sup>	Shared <sup>b</sup>	$D_{XY}^{c}$	$K_{\rm ST}^{*d}$
A-B	ITS	7	0	0.0303	1
	28S	12	0	0.0182	0.917
	ACT	19	2	0.0582	0.323
	TUB	30	2	0.0761	0.502
	Mean			0.0457	0.686
A-C	ITS	8	0	0.0346	1
	28S	11	0	0.0169	0.948
	ACT	12	3	0.0491	0.309
	TUB	31	1	0.0903	0.526
	Mean			0.0477	0.696
	ITC	7	0	0.0202	1
A-D	200	6	0	0.0303	0.842
	205 ACT	17	0	0.0117	0.042
		1 /	0	0.0331	0.101
	TUB	40	1	0.08/0	0.425
	Mean			0.0457	0.607
B-C	ITS	5	0	0.0217	1
	28S	8	0	0.0130	0.829
	ACT	8	1	0.0300	0.330
	TUB	15	2	0.0540	0.434
	Mean			0.0297	0.574
		_	_		
B-D	ITS	2	0	0.0087	1
	28S	6	0	0.0110	0.650
	ACT	13	0	0.0332	0.393
	TUB	26	0	0.0617	0.332
	Mean			0.0286	0.594
C-D	ITS	5	Ο	0.0215	1
С-D	285	5 4	0	0.0091	0.686
	$\Delta CT$	-	0	0.0215	0.000
	TUR	10	0	0.0213	0.194
	Hoor	10	0	0.0308	0.293
	wiean			0.0222	0.343

<sup>a</sup> number of fixed differences between lineages <sup>b</sup> number of shared mutations <sup>c</sup> average number of nucleotide substitutions per site between lineages ( $D_{XY}$ ) <sup>d</sup> Hudson's K-statistic of genetic differentiation ( $K_{ST}^*$ )

# 1.1.2 Distribution des espèces cryptiques de *Plasmopara viticola* sur les *Vitis* spp. du Nord-Est américain

#### Introduction

Comme décrit dans la partie 1.1.1, il existe quatre espèces de mildiou de la vigne: [A] *P. viticola* f. sp. *riparia* (présente sur *V. riparia* et quelques hybrides), [B] *P. viticola* f. sp. *aestivalis* (présente sur *V. aestivalis, V. labrusca, V. vinifera* et quelques hybrides), [C] *P. viticola* f. sp. *vinifera* (présente sur *V. vinifera* et quelques hybrides), [D] *P. viticola* f. sp. *quinquefolia* (présente sur *P. quinquefolia*). C'est dans ce contexte que nous nous sommes questionnés sur la distribution de ces espèces cryptiques sur les *Vitis* spp. à l'échelle du Nord-Est américain. A partir d'un échantillonnage réalisé dans l'aire d'origine du mildiou au cours de plusieurs campagnes de terrain, nous avons étudié la distribution des différentes espèces cryptiques de mildiou sur ses plantes-hôtes principalement sauvages mais également cultivées.

#### Matériel et méthodes

#### Collection des isolats de mildiou et extraction d'ADN

Entre 2007 et 2010, une prospection de grande ampleur a été réalisée sur les vignes cultivées et sauvages du Nord-Est américain (*V. labrusca, V. vinifera, V. aestivalis, V. vulpina, V. cinerea* et des hybrides interspécifiques) au Canada (Québec) et aux Etats-Unis (Floride, Michigan, Caroline du Nord, New York, Ohio, Pennsylvanie, Virginie et Virginie occidentale). Au total, 2500 isolats ont été collectés sur 94 sites d'échantillonnage différents. Nous avons analysé entre un et cinq isolats pour chaque plante et sur chaque site géographique représentant donc un total de 896 isolats.

Les isolats correspondent à la sporulation présente sur 1cm<sup>2</sup> de feuille de vigne infectée de mildiou. Les fragments de feuilles infectées obtenus ont été lyophilisés durant une nuit, et l'ADN de chaque isolat a été extrait selon la méthode standard au cetyl-trimethyl-ammoniumbromide (CTAB), phenol-chloroform suivi d'une précipitation à l'isopropanol comme expliqué dans la partie 1.1.

### Caractérisation des espèces cryptiques de P. viticola

La région de l'ITS1 (internal transcibed spacer region 1) a été retenue pour la caractérisation des espèces cryptiques. Cette région présente 15 SNP qui déterminent quatre allèles

correspondant chacun à une espèce. Dans un premier temps, un isolat par plante-hôte de chaque parcelle a été séquencé par la méthode de Sanger, soit 231 isolats. Les séquences ont été assemblées et vérifiées comme indiqué dans la partie 1.1 et comparées aux allèles de référence identifiés précédemment. Dans un second temps, afin de caractériser rapidement un grand nombre d'isolats, nous avons développé un test rapide via une méthode de digestion enzymatique de l'ITS. Le test permet de reconnaitre les 4 allèles par la technique de CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) qui consiste à cliver les séquences dans les zones de polymorphisme déjà connues. La région ITS1 de chaque isolat a été amplifiée par PCR selon le protocole expliqué dans la partie 1.1. Les produits PCR ont ensuite été digérés par 3 enzymes (*XmnI*, *TfiI* et *AseI*), en parallèle. Après migration sur gel d'agarose des produits de digestion, les profils de migration obtenus permettent de discriminer les espèces de mildiou (Tableau 1).

Tableau 1 : Taille des fragments de la digestion enzymatique des produits PCR ITS1 en fonction de la plante-hôte et de l'enzyme utilisée.

[Table 1 : Fragment sizes resulting from enzymatic digestion of ITS1 PCR products depending on the host plant of origin and enzyme used.]

	Α	В	С	D
TAI	71	71	71	
1)/1	167	167	167	238
1 a aI			100	
Asel	238	238	138	238
		66	66	66
XmnI	101	71	71	71
	137	101	101	101

#### **Résultats et discussion**

#### Mise en évidence d'une nouvelle espèce cryptique de P. viticola

Sur les 896 isolats testés, une amplification de la région ITS1 a été obtenue pour 768 isolats. L'espèce cryptique a laquelle appartient chaque isolat a été déterminée par séquençage pour 220 isolats. La technique de CAPS a permis de caractériser l'espèce de *P. viticola* pour chaque isolat. Les isolats se répartissent ainsi : 302 isolats de l'espèce A, 314 isolats de l'espèce B, 126 isolats de l'espèce C et 37 isolats de l'espèce D.

Onze isolats collectés sur *Vitis vulpina* en Virginie n'ont pas pu être assignés à une espèce cryptique particulière du fait de leur profil enzymatique difficilement interprétable. Afin d'éclaircir leur statut, ces isolats ont été séquencés. Le séquençage a permis de mettre en évidence l'existence d'un nouvel allèle pour la région génomique de l'ITS1 correspondant à
une nouvelle espèce cryptique de mildiou de la vigne. Afin de valider l'existence de cette nouvelle espèce, la région 28S de l'ARN ribosomal et le gène codant pour la ß-tubuline ont été séquencés en complément de l'ITS1. Ce séquençage a mis en évidence l'existence d'un allèle supplémentaire pour la région du 28S et deux pour la ß-tubuline. Les relations phylogénétiques entre ces nouveaux allèles et les allèles précédemment identifiés ont été reconstruites à l'aide de la méthode de maximum de vraisemblance (partie 1.1.1) (Figure 1).



Figure 1 : Arbre phylogénétique (ML, Maximum Likelihood) présentant les relations entre les allèles obtenus pour les séquences de l'ITS1 (a), la ß-tubuline (b) et le 28S (c). Les valeurs de boostrap sont indiquées quand elles sont supérieures à 70%. (d) Arbre des espèces de *P. viticola* construit avec le logiciel \*BEAST sur la base des séquences des trois loci (ITS1, ß-tubuline, 28S) pour les isolats de *P. viticola* et un isolat de *P. sojae* (Ps). Les probabilités postérieures de chaque branche sont indiquées dans l'arbre. Les cinq espèces cryptiques de *P. viticola* sont identifiées par des couleurs dans les arbres (A : vert, B : rouge, C : orange, D : violet, E : bleu).

[Figure 1 : Phylogenetic tree (ML, Maximum Likelihood) presenting allele relationships using ITS1 (a),  $\beta$ -tubulin (b) and 28S sequences (c). Boostrap values are given when superior to 70%. (d) Species tree of P. viticola constructed using \*BEAST based on sequences of the three loci (ITS1,  $\beta$ -tubulin, 28S) on *P. viticola* isolates and one isolate of *P. sojae*. Posterior probabilities of the branches are given in the tree. The five *P. viticola* cryptic species are labeled on the trees using colors (A : green, B : red, C : orange, D : purple, E : blue).]

Les arbres phylogénétiques présentent cinq branches monophylétiques comportant chacune les allèles des mêmes isolats. Ces résultats indiquent donc l'existence d'une cinquième espèce cryptique au sein des populations de *P. viticola*. Par cohérence avec la nomenclature mise en place dans la partie 1.1.1, cette nouvelle espèce cryptique a été nommée E. Afin de reconstruire la structure phylogénétique entre les cinq espèces de mildiou de la vigne, un arbre des espèces a été construit selon le protocole expliqué dans la partie 1.1.1 (Figure 1d). Les branches de cet arbre des espèces ne sont pas solidement soutenues probablement en raison de la présence de données manquantes pour les isolats correspondant à l'espèce E. Cependant, il indique que l'espèce E est plus apparentée à l'espèce B qu'aux autres espèces.

# Répartition géographique des espèces en fonction de la plante hôte

Cette étude de la répartition géographique des espèces cryptiques de mildiou de la vigne à une large échelle a permis de confirmer et de compléter les résultats obtenus précédemment. Confirmant nos résultats précédents, l'espèce A est inféodée à l'espèce sauvage *V. riparia* et à quelques hybrides interspécifiques, en particulier Chancellor. L'espèce cryptique B est présente sur *V. aestivalis, V. labrusca, V. vinifera* et des hybrides interspécifiques. Finalement, l'espèce D reste inféodée à l'espèce sauvage *P. quinquefolia.* (Tableau 2, Figure 2).

L'espèce E, nouvellement identifiée, est inféodée à l'espèce sauvage *V. vulpina.* Concernant l'espèce cryptique C, nos résultats montrent que sa gamme d'hôte est plus large que celle identifiée précédemment (partie 1.1.1). En effet, elle est présente sur trois espèces sauvages (*V. aestivalis, V. vulpina, V. cinerea*) ainsi que dans les vignobles sur *V. vinifera* et sur les hybrides interspécifiques (Figure 2, Tableau 2).

Au final, on observe des différences importantes entre les espèces cryptiques pour leur gamme de plantes-hôtes (Tableau 2). En effet, les espèces cryptiques B et C possèdent une large gamme d'hôtes et sont ainsi des espèces généralistes, alors que les espèces cryptiques A, D et E sont des espèces spécialistes d'une seule plante-hôte (respectivement *V. riparia*, *P. quinquefolia*, *V. vulpina*).

La distribution géographique des espèces de mildiou semble aller en parallèle avec la gamme de plantes-hôtes ; ainsi, les espèces spécialistes (A, D, E) se trouvent limitées à l'aire de répartition des hôtes sauvages qu'elles infectent, alors que les espèces généralistes (B,C)

montrent une distribution plus large. L'aire de distribution de l'espèce C est particulièrement large, s'étendant sur tout le nord-est américain, du Michigan jusqu'en Floride.



Figure 2 : Répartition géographique sur le nord-est américain des différentes espèces cryptiques de mildiou de la vigne en fonction de la plante-hôte d'origine. Les isolats ont été regroupés par état. La taille des cercles est proportionnelle au nombre s'isolats.

[Figure 2 : Geographic repartition in nort-east America of the different grapevine downy mildew cryptic species depending on the host plant of origin. Isolates have been grouped by states. Circle sizes are proportional to number of isolates]

Tableau 2: Gamme d'hôtes en conditions naturelles des espèces cryptiques de P. viticola.

[Table 2: Host range in natural conditions of	of <i>P. viticola</i> cryptic species.]
---	---

	А	В	С	D	Е
V. riparia	Х				
V. labrusca		Х			
V. aestivalis		Х	Х		
V. vinifera		Х	Х		
V. cinerea			Х		
V. vulpina			Х		Х
P. quinquefolia				Х	
Hybrids	Х	Х	Х		

L'ensemble des données génétiques et expérimentales présentées ici révèlent, pour la première fois, toute la diversité du mildiou de la vigne dans son aire d'origine sur ses hôtes sauvages et cultivés.

# 1.2. Structure génétique au sein des espèces cryptiques de P. viticola

L'adaptation à une plante-hôte au sein d'une espèce d'agent pathogène requiert une variabilité dans les populations d'hôtes, ainsi qu'une corrélation négative entre les valeurs sélectives des individus sur les différents hôtes. Mais le processus d'adaptation ne peut se mettre en place que si les barrières aux flux de gènes entre compartiments (plantes-hôtes) sont suffisamment importantes pour empêcher la 'dilution' des combinaisons de gènes localement adaptés. Une façon indirecte de détecter des situations d'adaptation à la plante-hôte est donc d'étudier la structuration génétique des populations de pathogènes sur différentes plantes-hôtes présentes en sympatrie. Ainsi, la détection d'une différentes pourra être interprété comme un indice de l'existence d'une adaptation à la plante hôte. En outre, l'analyse de la structure de la diversité génétique des populations nous renseigne aussi sur l'importance relative des différentes forces évolutives dans l'adaptation du pathogène (recombinaison, migration, dérive, mutation). En particulier, l'existence d'une phase sexuée efficace se révèle particulièrement importante pour prédire le potentiel évolutif du pathogène. La recombinaison permet en effet de générer rapidement de nouvelles combinaisons de gènes pour s'adapter à son environnement.

Cette approche s'est déjà révélée fructueuse pour étudier l'adaptation des champignons pathogènes à leur plante-hôte. C'est notamment le cas pour *Botrytis cinerea*, un champignon Ascomycète nécrotrophe qui attaque la vigne et de nombreuses autres plantes cultivées et sauvages (tomate, tournesol, légumes, ronce, etc.). Dans une étude récente, Fournier et Giraud (2008) ont en effet montré que la structuration géographique est très faible au sein de cette espèce mais qu'il existe une différentiation génétique significative entre populations de *Botrytis* sur vigne et sur ronce. Celà révéle ainsi une limitation des flux de gènes entre ces deux plantes-hôtes en sympatrie. Le mildiou de la vigne est également un bon modèle d'étude pour aborder ces questions, car, comme nous l'avons décrit dans la partie 1.1.1, certaines espèces cryptiques de *P. viticola* se révèlent généralistes. Les espèces B et C notamment sont capables d'infecter différentes plantes-hôtes qui coexistent souvent à des échelles géographiques très restreintes (sur quelques hectares). Dans ce contexte, j'ai donc mis au point un nouveau jeu de marqueurs microsatellites et j'ai recherché l'existence de réductions de flux de gènes entre populations se développant sur différentes plantes-hôtes en sympatrie.

# **1.2.1.** Microsatellite markers for the characterization of native and introduced populations of Plasmopara viticola, the causal agent of grapevine downy mildew

# Introduction

Grapevine (Vitis vinifera) is cultivated worldwide and winemaking plays an important role in the economy of many countries. Grapevine downy mildew is considered one of the most important grapevine diseases in temperate climates. Plasmopara viticola (Berk.& Curt.) Berl. and de Toni, the causal agent of downy mildew, is a diploid heterothallic Oomycete native to North America. Conducting population genetic studies on this obligate endoparasite requires the development of species-specific markers such as microsatellites (SSRs) or single nucleotide polymorphisms (SNP). These markers allow high-throughput genotyping of isolates through extraction of DNA directly from plant lesions, avoiding time-consuming subculture of isolates on leaves. To date, eleven microsatellites and eight SNP markers have been described in P. viticola (Gobbin et al. 2003, Delmotte et al. 2006, Delmotte et al. 2011). Related to the economic importance of this pathogen species, the low number of genetic markers available in *P. viticola* reflects the difficulties that were previously encountered by research groups to isolate microsatellites using traditional methods (Gobbin et al. 2003, Delmotte et al. 2006, Dutech et al. 2007). Recent reports showed the relevance of combining the use of high-throughput sequencing technologies with bioinformatics to isolate microsatellite markers in non-model species (Abdelkrim et al. 2009, Malausa et al. 2011). So far, two methods based on shotgun pyrosequencing have been applied to microsatellite marker discovery: (i) direct shotgun pyrosequencing (DSP) by randomly sequencing the genome and searching a posteriori for microsatellite sequences (Abdelkrim et al. 2009, Lepais et al. 2011); (ii) microsatellite enriched-library pyrosequencing (MEP) that uses a microsatellite-enriched library as a basis for shotgun pyrosequencing (Malausa et al. 2011). Based on these two approaches, we report the development of 31 microsatellite markers for P. viticola that will increase the genotyping capacity for this major pathogen of grapevine. The new species-specific markers developed here provide the possibility of using a common set of microsatellites from local to continental geographic scales, opening the door for new genetic studies addressing P. viticola dispersal processes.

### In silico research of microsatellite markers

Two complementary methods were used to isolate new microsatellite markers in P. viticola. First, we searched for microsatellites in sequences generated by direct pyrosequencing of DNA and cDNA of *P. viticola* using 454 Genome Sequencer FLX Titanium (hereafter called 454). cDNA was prepared using zoospores from strains SC and SL (Table S1), using Clontech SMARTer PCR cDNA synthesis kit (Saint-Germain-en-Laye, France). Genomic DNA was prepared using zoospores from the strain Pv221 (Table S1) using DNeasy Plant Mini kit (Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA). Half a run of 454 was performed for each strain, yielding 369,105 reads for SC (69 Mb), 419,725 reads (139.5 Mb) for SL and 391,760 reads (130 Mb) for Pv221 (Table S2). Perfect di- to hexa-nucleotide microsatellite markers with a minimum of six repeat copies were searched with SciRoKo (Kofler et al. 2007) resulting in the identification of 131 non-redundant loci: 88 resulted from the direct shotgun pyrosequencing of genomic DNA of isolate Pv221, 53 from the direct shotgun pyrosequencing of cDNA of both SL and SC isolates. Primers were successfully designed for 52 of these loci using the Perl script DesignPrimer (Kofler et al. 2007). Second, we applied the high-throughput method developed by Malausa et al. (2011) based on coupling multiplex microsatellite enrichment and next-generation pyrosequencing to isolate microsatellites in the strain Pv221 (Table S1). Briefly, an adapted biotin-enrichment protocol was applied using eight biotin-labelled oligonuclotides - (AG)10, (AC)10, (AAC)8, (AGG)8, (ACG)8, (AAG)8, (ACAT)<sub>6</sub> and (ATCT)<sub>6</sub> – and the resulting library sequenced by 454. This led to the identification of 2,092 microsatellite motifs among 33,057 reads (6.6 Mb) (Table S2). The QDD pipeline (Meglécz et al. 2010) was used to analyse the sequences and design primers for amplification of the detected microsatellite motifs. Retaining sequences greater than 80 bp with perfect and compound microsatellites presenting a minimum of six repetitions led to the selection of 66 non-redundant loci. Therefore, the two approaches yielded a total of 118 microsatellite loci. None of the loci were common to the two approaches, and we did not identify in our sequence data set the loci previously described by Gobbin et al. (2003) and Delmotte et al. (2006).

GeneBank Annealing Size range Repeat motif Locus Accession no. Forward and Reverse Primer sequence (5'-3') temp (°C) alleles (bp) Method\* Pv61 JQ219983 F: TCTTCAGGTAGATGCGACCA 54°C 181-187 (CA)9 MEP R: GGTGACTCCTCGGACGAATA Pv65 JQ219972 (TC)9 57°C 196-202 F: CTTTGGCCCACGTCATAGTT MEP R: CGCTTTCGGTAGGTCCATTA Pv67 JQ219973 54°C 348-368 F: GCATTGAGCAGACACCTTGA (AC)9 R: GAGCGATAAGACCACAAATAGTGA MEP Pv74 JO219984 F: GCAACGTTGTGCAAGCTTTA (AG)7 54°C 176-182 R: GCATTATGATGGAGCTCACG MEP Pv76 JQ219974 F: CTGGTTGCTGATGCACTGAC (TC)7 57°C 136-140 R: GGCGGTGACTAAGTCGTTGT MEP JQ219985 238-242 Pv83 F: TGCAGCATTGTTTCATCCAT (TG)6 54°C R: ACACGGTACTTTGCGTTCCT MEP Pv87 JO219986 F: CGTGCAATTCAAACAACAGG (CT)6 54°C 152-154 MEP R: CTCACAAGGACGACTGGACA Pv88 JQ219987 (GT)6 202-208 54°C F: AATACCAAAAATGGCCGTCA MEP R: ACTCTCTTGCCAGCACCATC Pv91 JQ219975 (TG)6 54°C 142-146 F: ACCAGCCTTTGCGAAGATAA MEP R: TGAAAGTTACGTGTCGCACC Pv93 JQ219976 F: TAGCACCGGACTAGGCGTAT (GT)6 54°C 147-151 R: TGTACCCTGTTGCCCTCTTC MEP Pv96 JQ219977 F: TAGTCTTCAGATTTCGCCGT (CA)6 54°C 172 R: ATCATTGTAAGGCCAAGAAA MEP Pv100 JQ219978 F: TGATAAGATACCGCACAGGC (TA)6 54°C 231 R: TTGTTTGAAGCACTGAACGC MEP Pv101 JQ219979 F: AACACGGCGCCAAAGTATTA (CTT)6 54°C 263-266 R: GGGCATTAACGTGCAAATTC MEP Pv102 JQ219980 54°C 273 F: GATCGCCTTTTGCAATGTCT (TC)6 MEP R: AAAGGAGTCAACATGCTCGC 277-299 Pv103 JQ219981 54°C F: TGACCTACCACCCATTTACCA (TG)6 MEP R: ACGGTCAGGTCAAAAGCAGT Pv104 JO219982 54°C 321-324 F: CTACGCTCGAGGATGACACA (CA)6 R: GACATTGCCGCACCTAAGAT MEP Pv124 JQ219988 F: AACGACAGACGGATTTCTGC (AGG)6 57°C 139-142 R: GACCTCGAGCGCTTTGAC MEP Pv126 JQ219989 F: GCTCTCTGCAGGACGTTTTT (GAC)10 50°C 182-206 R: GCCGTTCTTCACGTTCTAGC MEP Pv127 JQ219990 F: TTGAAAACGCGGATAGGAAC (CA)9 54°C 213-223 MEP R: GAACGTCCAGTTCGGATTGT Pv133 JQ219991 F: AACGACAGACGGATTTCTGC (AGG)6 54°C 178-181 MEP R: CGACCTCGTCTTCACTTTCC Pv134 JQ219992 54°C 220-226 F: CATGCTCACGTAGACCTCCA (AG)6 MEP R: AATGCAGAGCTCCCATAACG Pv135 JQ219993 (TTC)10 57°C 217-220 F: GGTGCTCTGCTTCGACACTT DSPg R: CGCCACACAAGTCAACTTTC 57°C Pv136 JQ219994 (CTT)10 161-164 F: GTTTCGCTGAAACAGAAGGC DSPg R: ATCGTCCTGCCAGAAATGAC Pv137 JQ219995 F: AAGTGGGACACATCAAGCGT (AT)9 57°C 243-256 DSPg R: TGGCAATAAGTTTATGCCTCG Pv138 JQ219996 F: CGTGGATCATGACGTTTGTC (TA)9 57°C 225-235 DSPg R: CGACGAATCAGGGACAAGAT Pv139 JQ219997 F: GACCCGGACAATGGACTCTA (AC)8 57°C 126-133 DSPg R: CCGCCATGTATTGAACAGTG Pv140 JQ219998 F: GCTTGAGAAGAATGGAACGC (TA)9 57°C 172-201 DSPg R: CCCAGAAGGGTGATACGAGA Pv141 JQ219999 (TC)9 57°C 190-192 F: ACGACGACATGAGCTGTACG DSPg R: GAAGGTGGTGTCATGGGTTT Pv142 JQ220000 (CT)11 57°C 209-219 F: TTATGCCACGCAAATCTCTG DSPg R: AGGGCGAAATACGAGAGTGA Pv143 JQ220001 F: CCTGAATAAAGCAACACGCA (AT)8 57°C 121-135 DSPg R: TTGGCAGCAAATTGTACGAC Pv144 JQ220002 F: ACCAAGAATCGCACCTAACG (AT)12 57°C 161-192 DSPg R: GTCTGCCTGTTTGTCGGTTA Pv145 JQ220003 (AGA)6 57°C 204 F: GACTTGAAGGAAGCCATCCA DSPc R: CTCTCTCCAAAGTTCGTCGG Pv146 JQ220004 F: CTCGGACCTTGAAGAACGAC (GAG)7 57°C 242-245 DSPc R: ACGTGGCCTAGGTTCACAAG Pv147 JQ220005 (TCGACT)8 57°C 189-219 F: TCGACTACGAGTCCGAGAGG DSPc R: TTCTAGCTCGACGAAGACCG Pv148 JQ220006 57°C F: CGACCTATGTTTCGCCATTT (ACA)6 134-137 DSPc

R: GAGTCGTCGTAGAAGGCGTC

Table 1: Characteristics of the 35 microsatellite loci developed for *Plasmopara viticola*. \*Method of identification: MEP: Microsatellite-Enriched Pyrosequencing; DSPg: Direct Shotgun Pyrosequencing of genomic DNA; DSPc: Direct Shotgun Pyrosequencing of cDNA.

### **Amplification tests**

An initial PCR amplification was performed on a panel of 21 P. viticola isolates and on a negative control (V. vinifera). DNA extractions were performed as described in Delmotte et al. (2006). PCR amplifications were carried out in a final volume of 15  $\mu$ L reaction volume including 1.5 µL of 10X Buffer, 0.45 µL of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µL of 10 mM dNTPs, 0.3 µL of a dye-labeled forward primer and an unlabeled reverse primer (10 mM), 0.2 U of Taq Silverstar DNA Polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). PCR cycles were performed in an Eppendorf Mastercycler ep Gradient with the conditions as follows: an initial denaturation at 94°C for 4 min, 38 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at the appropriate annealing temperature (Table 1) and 35 s at 72°C, ending with a 5 min extension at 72°C. PCR products were migrated on agarose gel (1%) with a Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) and those presenting irregular amplification or multiple banding patterns were discarded. The remaining 44 loci were analysed as follows: one µL of PCR products (diluted at 1:100) was mixed with 8.86µL of Formamide and 0.14µL of GeneScan<sup>™</sup> - 600 LIZ<sup>®</sup> (internal lane size standard) and analysed in an Applied Biosystems 3130 capillary sequencer. Alleles were scored using the GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Finally, 35 primer pairs with clearly interpretable PCR products were retained (Table 1).

# **Polymorphism analysis**

In order to assess the polymorphism of these loci, we genotyped 96 *P. viticola* isolates from Europe and North America (Table S1). The European samples included isolates from two French regions (Gironde, N= 16; Vaucluse, N=16) and from the Rhine Valley in Germany (N=16), whilst samples from North America originated from Michigan (N=16), New York (N=16) and Virginia (N=16), USA. DNA extractions, PCR amplifications and automated genotyping at the 35 microsatellite loci were performed as described previously. The total number of alleles per loci (Na) and the observed and expected heterozygosity (*Ho* and *He*) were estimated for each locus using Genetix v4.05 (Belkhir *et al.* 2004). Tests for deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were conducted using the same software and the significance threshold was determined using Bonferroni's correction for multiple tests. The number of alleles per locus ranged from 1 to 16, with a mean ( $\pm$ SD) allele number per loci of 3.9 ( $\pm$ 2.8) (Table 2). In Europe, twelve loci (34.2%) were monomorphic, while only two loci (5.7%) were monomorphic in North America (Pv96, Pv145).

						····· I / 0 -								
					Europ	ē					North .	America		
			Ū	lobal	$H_0$ for	$H_0$ for	$H_{\rm O}$ for		Ē	obal	$H_0$ fo	$T H_0$ for		$H_0$ for
	Na total				Gironde	Rhine Valley	Vaucluse				Michig	an Virgini	aN	ew York
Locus		$N_{\mathbf{i}}$	Na	$H_0$	(France)	(Germany)	(France)	$N_{\rm I}$	Na	$H_0$	(USA	(USA)	(	(NSA)
Pv61	4	41	З	0.073	0.062	0.125	ı	43	4	0.349	0.071	0.333	)	.643
Pv65	5	42	Ч	0.523	0.562	0.437	0.562	25	4	0.24 *	0.333	0.429	0	.133 *
Pv67	ŝ	40	2	0.275	0.2	0.25	0.467	36	e	0.111	0.187	0.1		,
Pv74	4	38	Ч	0.026 *	* 1	0.071	ı	17	m	0.059 *	0.25	I		
Pv76	4	37	-		ı	ı	ı	37	ε	0.027 *	'	0.071	*	,
Pv83	4	41	Ч	0.073	0.067	0.125	ı	38	4	0.211 *	0.111	0.333	0	.143
Pv87	2	42		ı	·	ı	ı	45	2	*	I	I		ı
Pv88	4	40	Ч	0.15	0.286	0.062	0.062	44	m	0.25	1	0.267	0	.467
Pv91	ŝ	42	2	0.261	0.125	0.562	ı	45	ε	0.178	'	0.25	0	.267
Pv93	4	41	ς	0.317	0.133	0.562	0.125	33	Ч	0.333		0.25	0	.467
Pv96		42						32			'	1		
Pv100		31	-				ı	0	0		ı		'	
Pv101	e	42	0	0.595	0.562	0.5	0.875	27	ς	0.259 *	I	0.091		0.75
Pv102		30			·	ı	ı	0	0			ı	ı	
Pv103	4	42	2	0.309	0.312	0.5	ı	46	ς	0.283 *	0.312	0.067	U	.467
Pv104	7	42			·	ı	ı	39	ы	0.051 *	•	0.2		
Pv124	7	42	-	ı			ı	47	2	0.17	1	0.437	U	.067
Pv126	9	42	Ч	0.024	0.062		ı	42	9	0.547 *	0.429	0.6	0	.615
Pv127	5	39	ω	0.051	0.143	·	ı	35	S	0.657	0.692	0.6	0	.667
Pv133	7	41			·	ı	ı	42	ы	0.167	•	0.467		
Pv134	4	42	-					43	4	0.349 *	0.333	0.467	0	.231
Pv135	7	42	0	0.048	·	0.125	ı	45	ы	0.467	0.867	0.2	0	.333
Pv136	7	41	-					38	2	* '	1	1		ı
Pv137	9	41	ω	0.585	0.625	0.533	0.562	28	S	0.393 *	0.143	0.571	0	.286
Pv138	9	40	Ś	0.25 *	0.312	0.312 *	ı	38	9	0.263 *	0.154	0.467		0.1
Pv139	4	41	ς	0.146		0.375	ı	45	m	0.156	I	0.133	0	.357
Pv140	6	41	$\infty$	0.683	0.867	0.437	0.75	44	~	0.454 *	0.333	0.467	U	.571
Pv141	0	42	Ч	0.548	0.562	0.375	0.875	45	2	0.511	1	0.733		0.8
Pv142	5	42	2	0.238	0.375	0.125	0.312	13	Ś	0.308 *	1	0.333		ı
Pv143	5	42	ς	0.548	0.687	0.625	0.312	44	4	0.25 *	0.214	0.067	0	.467
Pv144	16	42	Ξ	0.667 *	0.75	0.812	0.375 *	4 4	Ξ	0.204 *	0.4	0.214	*	* '
Pv145		42					ı	45		•	1	'		ı
Pv146	2	42			ı		ı	34	2	0.206	0.111	0.429		•
Pv147	9	42	S	0.476	0.562	0.562	0.125	46	2	0.196 *	0.067	0.187	U	.333
Pv148	7	42	0	0.286	0.187	0.25	0.5	43 5	2	0.372	0.357	0.429	U	.333

Table 2: Population genetic analysis of 35 SSR loci in European and North American populations of *Plasmopara viticola* based on the genotyping of 96 isolates. For each population, 16 isolates were genotyped.

 $N_i$ : number of isolates amplified,  $N_a$ : number of alleles,  $H_0$ : observed heterozygosity, \* indicates significant deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium test after Bonferroni's correction for multiple tests (P<0.0014)

The reduced allelic polymorphism found in the European population may likely illustrate the founder effect and the demographic bottleneck resulting from the introduction of grapevine downy mildew in Europe in the late 1870's (Chen *et al.* 2007). It is worth noting that two loci, found to be monomorphic in Europe, could not be successfully amplified in American isolates (Pv100, Pv102). This result might reflect the fact that microsatellite discovery was performed on sequences obtained from European strains of the pathogen.

*Plasmopara viticola* reproduces clonally for part of the year, which can result in the spread of identical multilocus genotypes. We found 89 distinct multilocus genotypes (G) among the 96 isolates genotyped (N) (G/N = 0.93) indicating limited resampling of clones. The seven repeated multilocus genotypes were found in Vaucluse (N=6) and in New York (N=1). Since clonal amplification of genotypes can affect data interpretation, subsequent Hardy-Weinberg tests were performed using only one copy per multilocus genotype identified (N=89). The expected heterozygosities ranged from 0.024 to 0.888. Among the 31 polymorphic microsatellite markers, only five presented a deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Significant deficit in observed heterozygotes were detected at only 3 loci (Pv74, Pv138, Pv144) in Europe (Table 2). For North American populations, 15 loci presented a significant deficit in heterozygotes but this number fell to 3 (Pv65, Pv76, Pv144) when the analysis was performed separately on the 3 geographic populations (Table 2). The occurrence of null alleles is the most likely explanation for the within population heterozygotes deficits detected at these loci (Chakraborty *et al.* 1992).

#### Conclusions

The combined use of high-throughput sequencing technologies and bioinformatics led to the isolation and development of 31 new microsatellite markers for *P. viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. Our results suggest that a similar approach will be successful for the discovery of microsatellites in other non-model plant-pathogenic species. These 31 new microsatellite loci provide a new tool for conducting large-scale population genetic studies that will increase our understanding of the worldwide genetic structure of this invasive plant pathogen.

# Supplementary information

Appendix 1: Date of collection and geographical origin of *Plasmopara viticola* strains and populations analysed in this study.

Sample name	Number of isolates	Year	Location	Country	GPS p	osition
Strains						
Pv221	1	2009	Blanquefort	France	N 44° 55' 14.4336"	W 0° 38' 30.5916"
SC	1	2005	Colmar	France	N 48° 3' 51.3396"	E 7° 20' 2.5044"
SL	1	2008	Lednice	Czech Republic	N 48° 47' 28.6044"	E 16° 47' 42.4278"
Populations						
Gironde	16	2003	Sauternes	France	N 44° 31' 59.466"	W 0° 19' 58.1874"
Rhine Valley	16	2003	Freibourg	Germany	N 47° 58' 27.6672"	E 7° 48' 16.704"
Vaucluse	16	2005	Sorgues	France	N 44° 1' 51.0846"	E 4° 51' 41.8968"
Michigan	16	2010	Fennville	USA	N 42° 35' 59.9208"	W 86° 9' 13.7514"
Virginia	16	2010	Hidden Brook	USA	N 39° 12' 18.6366"	W 77° 29' 57.861"
New York	16	2010	Geneva	USA	N 42° 52' 12.525"	W 77° 2' 38.5368"

Appendix 2: Sequencing summary information for the different methods used for SSR discovery.

Method*	Isolate	Number of	Total length	Average read
		reads	(Mb)	length (nt)
MEP	Pv221	33,057	6.6	199
DSPg	Pv221	391,760	130	333
DSPc	SC	369,105	69	187
DSPc	SL	419,725	139.5	333

\*Method of identification: MEP: Microsatellite-Enriched Pyrosequencing; DSPg: Direct Shotgun Pyrosequencing of genomic DNA; DSPc: Direct Shotgun Pyrosequencing of cDNA

# **1.2.2.** Structure génétique des populations des espèces B et C de *P. viticola* en fonction de la plante-hôte

#### Introduction

Parmi les différentes espèces de mildiou de la vigne, deux espèces se révèlent généralistes. En effet, les espèces B et C de *P. viticola* sont présentes sur une large gamme d'hôtes diversifiés. C'est pourquoi, les espèces B et C de *P. viticola* représentent de bons modèles pour étudier la structuration des populations d'agent pathogène sur différentes plantes-hôtes présentes en sympatrie. Dans cette partie, nous avons étudié la structure génétique des populations de *P. viticola* au sein des espèces B et C. En particulier, nous nous sommes demandés si la sélection par la plante-hôte pouvait conduire à l'existence de barrières aux flux de gènes entre les populations au sein des espèces cryptiques de mildiou de la vigne. Dans le but de répondre à cette question, nous avons génotypé à l'aide des nouveaux marqueurs microsatellites (partie 1.2.1) les isolats des espèces B et C identifiés dans la partie 1.1.2.

### Matériel et méthodes

#### Isolats de mildiou



Figure 1 : Origine géographique et plante-hôte d'origine des isolats de *P. viticola*. Une description plus détaillée des échantillons est fournie dans l'annexe 3.

[Figure 1 : Geographical origin and source host plant of *P. viticola* isolates. A detailed description of the samples is presented in annexe 3.]

Tous les isolats correspondants aux espèces cryptiques B et C identifiées dans le chapitre 1.1.2. ont été utilisés pour cette étude. Au total, l'échantillonnage comprends 395 isolats collectés sur *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. aestivalis*, *V. cinerea*, *V. vulpina* et de différents hybrides interspécifiques provenant de 50 parcelles différentes (Figure 1, Annexe 3).

Tableau 1 : Caractéristiques des locus microsatellites utilisés dans cette étude : nom du locus, taille attendue des allèles, couleur du fluorophore, température d'hybridation (°C), numéro de mélanges des produits PCR.

[Table 1 : Characteristics of the microsatellite locus used in this study : locus name, expected size range of alleles, fluorophore dye, annealing temperature (°C), number of the PCR products mix.]

Locus name	Expected	Dye	Annealing	PCR
	size range		temp (°C)	products
	of alleles			mix
Isa	112-138	PET	54°C	1
Pv14	120-126	VIC	54°C	1
Pv17	140-150	6-FAM	54°C	1
Pv88	202-208	6-FAM	54°C	1
Pv13	211-225	NED	54°C	1
Pv16	238-249	PET	54°C	1
Pv96	172	VIC	54°C	2
Pv141	190-192	VIC	57°C	2
Pv143	121-135	6-FAM	57°C	2
Pv134	220-226	6-FAM	54°C	2
Pv103	279-299	PET	54°C	2
Pv147	189-219	NED	57°C	3
Pv126	182-206	PET	50°C	3
Pv127	213-223	VIC	54°C	3
Pv135	217-220	6-FAM	57°C	3
Pv83	238-242	VIC	54°C	3

# Identification de l'espèce de mildiou

*Analyse génétique*. Sur la base des combinaisons alléliques, chaque isolat a été assigné à un génotype multilocus (GML) avec un seuil de différence de zéro (seul les isolats avec des allèles identiques à chaque locus ont été groupés dans un même GML) en utilisant le programme GENODIVE (Meirmans et Van Tienderen, 2004). Puisque l'existence de clones peut influencer l'analyse des données, un seul représentant par génotype a été conservé pour la suite des analyses.

Les isolats ont été regroupés uniquement sur la base de leur génotype sans *a priori* sur leur population d'origine et suivant deux méthodes : une analyse bayésienne et une analyse multivariée. Dans un premier temps, nous avons utilisé le logiciel STRUCTURE v. 2.3.3 (Pritchard *et a*l. 2000) pour tester la structure génétique au sein de nos isolats sans *a priori* sur leur plante-hôte, la zone d'échantillonnage et l'espèce de mildiou à laquelle ils appartiennent.

Un modèle avec admixture a été utilisé. Les chaines de Markov (MCMC, Markov Chain Monte Carlo) ont été répliquées 5.10<sup>5</sup> fois avec pour chaque simulation une période de *burn*in de 10<sup>5</sup> itérations. Nous avons effectué 10 simulations différentes pour chacune des K valeurs (K = 1-10), K correspondant au nombre de groupes inférés. Le nombre de groupes le plus vraisemblable a été calculé en suivant l'approche décrite par Evanno et al. (2005) et a été confirmé en se basant sur la variance du logarithme de la probabilité des données successives entre les valeurs de K. Dans un deuxième temps, les isolats ont été groupés à l'aide du package 'adegenet' (Jombart, 2008) sous R v.2.15.0 (R Development Core Team, 2008). Contrairement aux méthodes bayésiennes comme celle implémentée dans STRUCTURE, les méthodes multivariées basées sur des ACP (Analyse en Composantes Pincipales) ne font pas d'hypothèses sur les modèles génétiques sous-jacents tels que l'équilibre de Hardy Weinberg ou l'absence de déséquilibre de liaison entre les locus (Jombart et al. 2008). Après inférence du nombre le plus vraisemblable de groupes et assignation de chaque isolat aux différents groupes obtenus, une analyse discriminante en composante principale a été effectuée. Dans l'analyse, 50 composantes principales ont été retenues dans l'étape de transformation des données, ce qui correspond à 80% du total de la variabilité génétique.

Pour chacun des groupes d'isolats révélés par les méthodes d'assemblage, la richesse allélique (Ar), l'hétérozygotie observée ( $H_0$ ), l'hétérozygotie attendue non biaisée ( $H_E$  n.b.) et le  $F_{IS}$  par locus ont été calculés avec le logiciel Genepop (Rousset 2008). De plus, le  $F_{ST}$  par locus a été calculé en comparant les groupes deux à deux.

#### Résultats

*Analyse multilocus.* Les 16 loci ont révélè un total de 139 allèles avec un nombre d'allèle par locus allant de 4 à 14. Sur les 395 isolats génotypés, 382 génotypes multilocus (GML) différents ont été identifiés dont 372 sont uniques. Les 10 GML répétés ne sont présents uniquement qu'en 2 ou 3 copies (Tableau 2). Les isolats possédant le même GML proviennent systématiquement de la même parcelle et de la même plante-hôte. Le GML 096 a été identifié pour deux isolats prélevés sur la même parcelle et la même plante-hôte mais sur deux cépages différents, de même pour le GML 202, mais dans une parcelle différente.

*Classement des isolats.* Un seul représentant de chaque génotype multilocus a été inclu dans les analyses de regroupement des isolats en fonction de leur génotype. Le classement des isolats via le programme STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) prédit un maximum de séparation des données en trois groupes. La différentiation génétique entre les 3 clusters est

élevée avec des  $F_{ST}$  compris entre 0.24 et 0.39. La distribution des fréquences alléliques entre les trois clusters est significativement différente à tous les loci (Tableau 3).

Tableau 2 : Caractéristiques des génotypes multilocus (GML) répétés qui ont été identifiés parmi 395 isolats de *P. viticola* génotypés à l'aide de 16 marqueurs microsatellites.

[Table 2 : Characteristics of the multilocus genotypes (MLG) repeated identified among 395 isolates of *P. viticola* genotyped using 16 microsatellite markers.]

Repeated MLG	n	Sampling State	Sampling Site	Host plant(s)	Cultivar	Sampling year(s)	Cluster K=3
MLG 002	3	Canada	Ripon	hybrid	Sainte-Croix	2009	1
MLG 003	2	Canada	Ripon	hybrid	Sainte-Croix	2009	1
MLG 010	3	Michigan	Gibbs Farm	hybrid	Marquis	2010	1
MLG 096	2	North Carolina	Gibsonville	Vitis vinifera	Merlot/Cabernet Franc	2006	1
MLG 148	2	New York	Geneva	Vitis vinifera	Lakemond	2010	1
MLG 189	2	Virginia	Blacksburg	Hybrid	Unknown	2010	1
MLG 202	2	Virginia	Surry County	Vitis vinifera	Sangiovese/Chardonnay	2006	1
MLG 220	3	Virginia	Amrhein	Vitis vinifera	Aglianico	2010	1
MLG 244	2	Virginia	Accomack County	Vitis vinifera	Chardonnay	2006	1
MLG 317	2	Michigan	Jackson	Vitis vinifera	/	2010	2

Tableau 3 : Différenciation génétique globale et pour chaque locus entre les groupes génétiques pris deux à deux. Le niveau de significativité du  $F_{ST}$  est indiqué par le nombre d'étoiles (\* : P < 0.05 ; \*\* : P < 0.01 ; \*\*\* : P < 0.001).

[Table 3 : Pairwise genetic differentiation (global and by locus) between the genetic clusters identified using the program STRUCTURE and the dPCA. The level of significance of  $F_{ST}$  is indicated by stars (\* : P < 0.05 ; \*\* : P < 0.01 ; \*\*\* : P < 0.001).

	F <sub>ST</sub>	$F_{\rm ST}$	F <sub>ST</sub>
	(groupe1/groupe2)	(groupe1/groupe3	)(groupe2/groupe3)
Pv14	0.3789***	0.4092***	0.0100***
PvG33	0.5533***	0.4371***	0.6508***
PvG25	0.4171***	0.6063***	0.4087***
Pv126	0.2335***	0.3183***	0.6118***
EST9	0.1628***	0.0732***	0.3033***
Pv16	0.0713***	-0.0078*	0.0635***
Pv134	0.1327***	0.5480***	0.3715***
Pv127	0.3718***	0.4980***	0.0562***
PvG2	0.1088***	0.3651***	0.0904***
isa	0.1521***	0.4546***	0.3802***
pv96	0.0115***	0.6259***	0.7329***
Pv88	0.2032***	0.4361***	0.2029***
Pv13	0.0445***	0.2475***	0.1900***
Pv17	0.1087***	0.0940***	0.0817***
Pv103	0.1660***	0.4611***	0.6457***
Pv83	0.0816***	0.3008***	0.1262***
Global	0.2442***	0.3964***	0.3472***

L'analyse multivariée basée sur la détermination du nombre de groupes suivi d'une analyse discriminante en composante principale indique également l'existence de trois groupes. Les groupes déterminés par l'analyse multivariée sont parfaitement identiques aux groupes déterminés avec l'analyse bayésienne (Figure S1).

*Caractérisation des groupes identifiés*. Les groupes 1, 2 et 3 rassemblent respectivement 117, 197 et 68 génotypes multilocus différents. Le nombre moyen d'allèles par locus est semblable pour les groupes 1 et 2 (respectivement, 6.31, et 6.68) alors qu'il est deux fois plus faible pour le groupe 3 (3.43). Parmi les 16 loci, tous présentent une déviation à l'équilibre de Hardy Weinberg pour les groupes 1 et 2 alors que la moitié d'entre eux sont à l'équilibre pour les isolats du groupe 3. Dans les 3 groupes, un déficit d'hétérozygotes (H<sub>0</sub><0,50) est observé.

Tableau 4 : Caractéristiques génétiques des 3 groupes de *P. viticola* identifiés par le programme STRUCTURE et par la dACP. Le niveau de significativité d'écart à l'équilibre de Hardy Weinberg est indiqué par le nombre d'étoiles (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001).

[Table 4 : Genetic characteristics of the 3 clusters of P. viticola identified using the program	nm
STRUCTURE and the dPCA. Significant deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium test	is
indicated by stars (* $P < 0.05$ , ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ ).]	

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
P. viticola species	С	В	В
Sample size (N)	129	198	68
Number of distinct MLG (G)	117	197	68
Mean number of alleles per locus	6.31	6.68	3.43
H <sub>E</sub> n.b	0.53	0.52	0.38
H <sub>0</sub>	0.26	0.41	0.26
$F_{\rm IS}$ per locus			
Pv14 PvG33 PvG25 Pv126 EST9 Pv16 Pv134 Pv127 PvG2 isa pv96 Pv88 Pv13 Pv13 Pv17 Pv103	0.3545* 0.8552* 0.2110* 0.1333* -0.0759 0.8105* 0.5700* 0.6787* 0.4198* 0.5632* 0.7662* 0.5345* 0.6952* 0.3481* 0.8259*	0.1629* 0.2551* -0.0232* -0.0556 0.2425* 0.4439* 0.1306* 0.2101* -0.0514 0.1353* 0.5574* 0.1789* 0.2433* 0.4064* 0.1486*	-0.0916 0.5691* -0.0176 -0.1892 -0.0075 0.9294* -0.0924 -0.0138 -0.4757* -0.0924 0.7559* -0.0236 0.5093* 0.1293* 0.5484*



Figure 2 : Analyse discriminante en composante principale effectuée sur les 382 génotypes multilocus (GML) de *P. viticola*. Chaque point correspond à un GML. Les couleurs indiquent soit (A) les groupes identifiés par les deux méthodes de regroupement, soit (B) l'espèce de *P. viticola* à laquelle chaque isolat appartient, soit (C) la plante-hôte d'origine des isolats, soit (D) l'origine géographique des isolats (les parcelles ont été rassemblées en fonction de l'Etat d'orgine).

[Figure 2 : Discriminant analysis of principal component performed on the 382 *P. viticola* multilocus genotype (MLG). Each point represents one MLG. Colors indicate (A) clusters identified by the two method of clustering, (B) the *P. viticola* species, (C) the host plant of origin, (D) the geographical origin of each isolate (sampling sites were pooled by State of origin.]

Les groupes identifiés séparent les isolats selon l'espèce de mildiou à laquelle ils appartiennent : tous les isolats appartenant au groupe 1 correspondent à l'espèce C de *P. viticola* alors que tous les isolats appartenant aux groupes 2 et 3 correspondent à des isolats de l'espèce B (Tableau 4, Figure 2). Le groupe 1 comprend donc des isolats collectés sur *V. vinifera* (uniquement dans le Michigan), *V. aestivalis, V. vulpina, V. cinerea* et les hybrides.

Le groupe 2 comprend tous les isolats de l'espèce B provenant de *V. vinifera* (sauf ceux du Michigan), tous les isolats de *V. aestivalis* (sauf ceux de la Floride qui sont de l'espèce C), des isolats de *V. labrusca* (5 de New York, 8 de Virginie, 1 de l'Ohio, 2 du Michigan) et des isolats provenant d'hybrides. Le groupe 3 est restreint géographiquement à la zone du Michigan et de l'Ohio. Il regroupe tous les isolats de l'espèce B de *V. labrusca* (n=49) du Michigan et de l'Ohio (sauf trois qui se retrouvent dans le groupe 2) ainsi que tous les isolats isolats de *V. vinifera* (n=19) du Michigan appartenant à l'espèce B.

A l'échelle du Nord-Est américain, les isolats appartenant à une même plante-hôte se retrouvent dans plusieurs groupes : par exemple, les isolats collectés sur *V. vinifera* se répartissent dans le groupe 1 (espèce C, n=40 isolats), dans le groupe 2 (n=111) et dans le groupe 3 (n=21) (Figures 2 et 3). Réciproquement, les groupes comprennent des isolats d'une même espèce de mildiou ayant été prélevés sur diverses plantes-hôtes. Ainsi, pour l'espèce C de mildiou, l'analyse ne permet pas de discriminer entre les isolats prélevés sur *V. vulpina, V. cinerea* et *V. aestivalis*. Pour l'espèce B, la situation est plus complexe puisque nous observons deux groupes bien différentiés génétiquement, l'un de ces groupes étant restreint à la zone géographique du Michigan/Ohio (groupe 3). En regardant la situation dans le Michigan, on observe une forte structuration par la plant-hôte : en effet, dans le Michigan, les isolats issus de *V. aestivalis* appartiennent tous au groupe 2 tandis que les isolats de *V. vinifera* et *V. labrusca* appartiennent au groupe 3. Cette situation est cependant restreinte au cas du Michigan puisque, lorsqu'on élargit l'analyse à tout le Nord-Est américain, on observe que les isolats issus de *V. labrusca* se retrouvent assignés au groupe 2 (et non au groupe 3).

### Discussion

Sur la base du génotypage de 16 marqueurs microsatellites, nous avons examiné la structure génétique des populations américaines de *P. viticola* appartenant aux espèces cryptiques généralistes B et C. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de structuration génétique en fonction de la plante-hôte (*V. vinifera*, *V. cinerea*, *V. vulpina*, hybrides) au sein de l'espèce cryptique C. Pour l'espèce B, en revanche, les choses sont moins tranchées : les isolats du groupe 2 sont présents sur *V. aestivalis*, *V. labrusca*, *V. vinifera* et les hybrides interspécifiques. Les isolats du groupe 3 ont une gamme d'hôte plus restreinte puisqu'ils sont présents uniquement sur *V. vinifera* et *V. labrusca*. Au final, les différentes plantes-hôtes ne constituent donc pas, dans le cas des espèces cryptiques de mildiou B et C, des barrières aux

flux de gènes comme cela a pu être décrit dans le cas d'autres pathosystèmes (Couch *et al.* 2005, Fournier et Giraud 2008).



Figure 3 : Distribution des isolats de *P. viticola* sur le nord-est américain en fonction de leur parcelle d'échantillonnage, de leur plante-hôte d'origine et du groupe dans lequel ils ont été assignés. La taille des cercles est proportionnelle au nombre s'isolats.

[Figure 3 : Distribution of *P. viticola* isolates in nort-east America depending on their sampling site, their host plant of origin and the cluster on which they were assigned. Circle sizes are proportional to number of isolates]

Si nos donnés invalident l'hypothèse d'une adaptation à la plante-hôte au niveau intraspécifique, en revanche elles indiquent qu'il existe bien une barrière au flux de gène au sein de l'espèce B notamment dans la région du Michigan. En effet, le groupe 3 – incluant tous les *V. labrusca* et tous les *V. vinifera* de l'espèce B du Michigan – se révèle génétiquement différentié du groupe 2. Ce groupe pourrait en fait résulter d'une adaptation locale de *P. viticola* aux cultivars de *V. labrusca* (Concord, Niagara) qui sont abondamment plantés dans cette région du Michigan pour la production de jus de raisin. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les isolats issus de *V. labrusca* venant de cette région se sont révélés très agressifs sur leur plante-hôte indiquant un fort niveau d'adaptation locale (cf. inoculation

croisée présentée dans la partie 1.1.1). Cette population adaptée à *V. labrusca* aurait pu par la suite migrer vers les *V. vinifera* présents en sympatrie, ce qui expliquerait pourquoi les isolats de *V. vinifera* du Michigan sont tous du groupe 3 dans les zones d'échantillonnage où *V. labrusca* est présent. La présence d'isolats du groupe 3 sur *V. labrusca* de l'Ohio pourrait résulter de la propagation de ces isolats via les pépinières du Michigan qui produisent massivement les cultivars Concord et Niagara. L'idée d'une adaptation aux *V. labrusca* chez le mildiou de la vigne nécessite cependant d'être modérée : en effet, dans l'autre région où la culture des *V. labrusca* est historique (New York), les isolats issus de *V. labrusca* n'appartiennent pas au groupe 3 comme dans le Michigan. Même si cette observation empêche toute généralisation sur l'adaptation de mildiou à *V. labrusca*, elle n'invalide pas l'idée que, dans le cas de l'espèce B, une rupture aux flux de gènes entre les populations de *V. labrusca* et les autres (*V. aestivalis*, hybrides) ait pu avoir lieu dans le Michigan. Les résultats des expériences d'inoculations croisées présentées dans la partie 1.1.1, montrant un faible développement des isolats de *V. aestivalis* sur *V. labrusca* et vice-versa, semblent donner support à cette hypothèse.

Enfin, nous ne pouvons pas exclure que la présence de deux groupes génétiques au sein de l'espèce B de mildiou résulte d'un isolement géographique dans cette région du Michigan. Cependant, il est difficile de comprendre quelles barrières géographiques auraient pu conduire à une telle structuration. Cette hypothèse semble d'autant moins plausible que dans une même parcelle, on trouve en sympatrie des isolats des deux groupes sur des plantes-hôtes différentes (groupe 2 sur *V. aestivalis* et groupe 3 sur *V. labrusca* et *V. vinifera*).

# **1.3. Conclusion générale**

Les résultats exposés dans ce premier chapitre révèlent l'importance du rôle joué par la plante-hôte dans l'adaptation du mildiou de la vigne. Ce processus s'accompagne de l'établissement de barrières aux flux de gènes qui sont détectables au niveau interspécifique avec l'existence de plusieurs espèces cryptiques spécialisées sur leur plante-hôte. En effet, nous avons montré que la spéciation écologique observée pour les espèces cryptiques de mildiou de la vigne est la résultante d'une spécialisation plante-hôte. La spécificité d'hôte de quatre des cinq espèces cryptiques de *P. viticola* observée dans les conditions naturelles a été confirmée par les études de pathogénicité et par les données morphologiques (taille des sporanges). Parmi les différentes espèces cryptiques, certains ont une large gamme d'hôte alors que d'autres ont une gamme d'hôte restreinte indiquant ainsi qu'au sein de ce complexe

d'espèces, certaines espèces sont spécialistes alors que d'autres sont généralistes. Cette spéciation écologique a été suivie d'une expansion de la gamme d'hôtes de trois espèces cryptiques de mildiou, des espèces sauvages de *Vitis* spp. vers les espèces cultivées suite à leur introduction dans l'agro-écosystème. Par exemple, lors de l'introduction de *V. vinifera* aux Etats-Unis, certaines espèces cryptiques ont pu émerger sur cette variété. Un deuxième niveau de spécialisation a été mis en évidence entre les compartiments sauvage et cultivé. En effet, l'expansion de gamme d'hôtes s'est accompagnée d'une augmentation de l'agressivité : sur les espèces cultivées, les isolats collectés sur les vignes cultivées sont plus agressifs que les isolats collectés sur les vignes sauvages.

En revanche, au niveau intraspécifique, nos données ne montrent pas de différenciation génétique au sein de l'espèce C. Cependant, elles montrent l'existence de deux groupes distincts au sein de l'espèce B. A l'échelle du Nord-Est américain, ces deux groupes ne sont pas différentiés en fonction de la plante-hôte. Cependant, à l'échelle du Michigan, seule région dans laquelle l'un des groupes est présent, une différenciation par la plante-hôte est observée.



- Chapitre 2 : Evolution des populations de mildiou face aux résistances de la vigne -

# **2.1. Introduction**

Dans les agro-écosystèmes, les populations de pathogènes sont en interaction avec des plantes sensibles mais également avec des plantes présentant des résistances auxquelles elles doivent s'adapter (Stukenbrock 2008). La résistance des plantes aux agents pathogènes peut être qualitative et donc reposer sur des interactions gène-pour-gène entre des gènes de résistance de la plante et des gènes d'avirulence du parasite (Flor, 1971). Il s'agit alors de résistances dites totales qui s'expriment par une réponse de type tout ou rien (résistance ou sensibilité) (Saint Clair 2010) et induisent de fortes pressions de sélection sur les populations de parasites. L'adaptation des parasites se traduit alors par le contournement de ces résistances dites spécifiques (boite 5, introduction). En effet, la plupart des variétés possédant des résistances de type gène-pour-gène ont été rapidement contournées suite à des modifications des populations d'agents pathogènes (Leach et al. 2001, Mac Donald et al. 2002, Parlevliet et al. 2002). La résistance des plantes peut également être quantitative et reposer sur un petit nombre de gènes mineurs (résistance polygénique). Ces résistances quantitatives conduisent à une diminution et non à une absence de la maladie (Saint Clair 2010) et permettent de restreindre la taille des populations d'agents pathogènes. L'adaptation des parasites à ces résistances quantitatives peut conduire à une érosion de la résistance, i.e. une diminution de l'efficacité des résistances. C'est le cas par exemple de la variété de blé Madsen dont la résistance quantitative a été graduellement érodée (Mundt 2002). Dans certains cas, les résistances quantitatives peuvent reposer sur un gène de résistance majeur, conduisant à des contournements de la résistance.

Le contournement et l'érosion de la résistance impliquent deux composantes différentes du pouvoir pathogène. Ils sont liés respectivement à la composante qualitative (nommée virulence ou pathogénicité) et quantitative (agressivité) du pouvoir pathogène. Dans le contexte de la pathologie végétale, la virulence correspond à la capacité du parasite à infecter son hôte; alors que l'agressivité correspond à la quantité de dommages causés à l'hôte par la maladie (Pariaud *et al.* 2009). Dans le cadre de l'agrosystème, des composantes de l'agressivité des isolats de l'agent pathogène telles que la taille des lésions, le temps de latence, la quantité de spores produites sont mesurés et interprétés comme des traits d'histoire de vie. Cependant, la réelle valeur sélective des isolats n'est pas mesurée puisque ni la partie

sexuée du cycle de vie de l'agent pathogène, ni l'impact de la maladie sur l'hôte (tel que la diminution de rendement et de qualité) ne sont pris en compte.

Un certain nombre d'études ont été menées afin de quantifier la variabilité de l'agressivité existante dans les populations d'agents pathogènes (Dowkiw *et al.* 2010, Talas *et al.* 2011). Ces études permettent de savoir s'il existe une diversité susceptible de conduire à une évolution des populations de parasites et à une érosion du niveau de résistance. La sélection sur des traits quantitatifs peut influencer l'évolution des agents pathogènes dans les agrosystèmes, résultant parfois dans une adaptation différentielle des populations aux cultivars de plantes cultivées. Ainsi, des situations d'adaptation des agents pathogènes aux variétés ont été mises en évidence pour plusieurs agents pathogènes majeurs des cultures. Dans le cas du mildiou de la pomme de terre, des populations de *P. infestans* marocaines et françaises se sont adaptées localement au cultivar dominant dans leur région, respectivement Désirée et Bintje, quelque soit leur niveau de résistance, résultant en une augmentation de leur agressivité (Andrivon *et al.* 2007). Dans le cas de la rouille brune du blé, le pathotype P1 de *Puccinia triticina* s'est adapté localement à la résistance quantitative de la variété Soissons largement répandue. Ce pathotype possède une période de latence plus courte et une production de spores plus élevée sur Soissons que les autres pathotypes (Pariaud *et al.* 2009b).

Un autre paramètre important qui conditionne l'adaptation des pathogènes est le coût associé à la virulence. Leonard (1997) a postulé qu'à chaque perte d'un gène d'avirulence est associé un coût de la virulence qui doit se manifester à la fois sur la variété sensible et sur la variété résistante. Ce coût associé à la virulence a été trouvé dans un certain nombre d'études, mais il y a d'autres exemples où l'évolution de la virulence ne semble pas se traduire par un coût associé (pour une revue voir Leach et al. 2001). L'une des approches permettant de déterminer s'il existe un coût associé à la virulence est de comparer la fitness d'isolats virulents et avirulents sur une variété sensible. Lehman et Shaner (1997) ont montré que les isolats de P. triticina, présents sur les variétés résistantes, produisent un plus grand nombre de spores avec une période de latence plus courte sur la variété résistante ; mais, sur la variété sensible, ces isolats produisent moins de spores que des isolats provenant de variétés sensibles. Cependant, Cowger et Mundt (2002) ont montré que, au sein d'une même parcelle, les variétés de blé partiellement résistantes conduisent à la sélection d'isolats de Mycosphaerrella graminicola plus agressifs que les variétés de blé sensibles. Ce dernier résultat va dans le sens des prédictions des modèles sur l'évolution de la virulence (ici dans le sens d'agressivité) dans les interactions hôtes/parasites : en effet, Gandon et Mickalakis

(2000) ont pu montrer que si la résistance qualitative (tout ou rien) de l'hôte réduit l'agressivité, la résistance quantitative des hôtes conduit quant-à-elle à une augmentation du niveau d'agressivité des populations d'agents pathogènes.

Dans le but d'évaluer la durabilité des résistances quantitatives, il est important de comprendre comment l'utilisation de ces résistances affecte l'évolution des agents pathogènes. Dans le cas du mildiou de la vigne, les populations de *P. viticola* sont soumises à la pression de sélection des résistances partielles de variétés de vignes qui ont été récemment déployées en Europe. Un premier cas de contournement de la résistance au mildiou de la vigne a été décrit chez la variété Bianca (Peressotti *et al.* 2010). Bianca contient le QTL *Rpv3* conférant une résistance partielle au mildiou de manière monogénique (Bellin *et al.* 2009). Il a été proposé récemment que la résistance d'une autre variété de vigne, Regent, soit également conférée par le QTL *Rpv3* (Schwander *et al.* 2012). C'est dans ce contexte que nous avons posé les questions suivantes :

(1) Existe-t-il d'autres cas de contournement (gènes de résistance majeurs) ou bien d'érosion de la résistance dans les populations de mildiou de la vigne? (2) Ces isolats sont-ils spécialisés sur leur plante-hôte? (3) L'agressivité des isolats issus de variétés résistantes estelle la même que celle des isolats issus des variétés sensibles? (4) Quelles sont les stratégies évolutives des isolats issus des variétés résistantes, i.e. quels traits d'histoire de vie évoluent en réponse à l'adaptation aux résistances quantitatives ? (5) L'utilisation des variétés résistantes entraine-t-elle une modification de la structure génétique des populations de mildiou sur la vigne ?

Pour répondre à ces questions, nous avons effectué des tests d'inoculations selon deux stratégies. Dans un premier temps, nous avons effectué des tests d'inoculations d'un petit nombre d'isolats de mildiou sur une large gamme d'hôtes dont les facteurs de résistance sont bien identifiés. Dans un second temps, nous avons inoculé une plus large gamme d'isolats sur des variétés inscrites et commercialisées mais dont le déterminisme génétique n'est pas systématiquement identifiée.



# 2.2. Matériel et méthodes

Plusieurs tests d'inoculations ont été effectués. Afin de faciliter la compréhension, les plans d'expériences sont présentés juste en amont des résultats de chacun de ces tests.

# Matériel végétal

Deux groupes de génotypes de vigne ont été utilisés dans les expérimentations. Pour les expériences de la partie 2.3.1, le groupe constituait un panel de 10 génotypes de vigne différents : deux cultivars sensibles de V. vinifera (Cabernet sauvignon, Muscat Ottonel), deux hybrides commercialisés pour leur résistance (Regent, Bianca), deux espèces sauvages de Vitis américains (V. riparia, V. rupestris), deux descendants d'un croisement ségrégeant pour les gènes de résistance de Muscadinia rotundifolia (7001H portant le QTL Rpv1, 7050H portant Rpv2), et deux descendants d'un croisement Chardonnay x Bianca ségrégeant pour le gène de résistance Rpv3 (18-030 sans QTL Rpv3, 18-008 avec QTL Rpv3). Pour les expériences de la partie 2.3.2, le groupe était constitué de six variétés hybrides commercialisées pour leur résistance au mildiou de la vigne dont le déterminisme de la résistance n'est pas toujours connu : Regent, Bronner, Cabernet carbon, Johanniter, Prior et Solaris, et une variété sensible : V. vinifera cv. Cabernet sauvignon. Les plantes du premier groupe étaient issues de boutures en bois. Les plantes du second groupe étaient greffées soudées sur le porte-greffe SO4. Une douzaine de plants par variété ont été cultivés en serre durant sept semaines avant le prélèvement des feuilles. Les plantes ont été cultivées en serre non chauffée en pots de 4L contenant un mélange de terreau et de perlite et arrosées avec un complément d'engrais.

La généalogie de ces différentes variétés hybrides est indiquée dans l'encadré 1.

#### Isolats de P. viticola

*Echantillonnage*. Les isolats ont été collectés sur des variétés résistantes portant des gènes de résistance au mildiou (isolats RES) et sur des plantes sensibles (isolats VIN). Un ensemble de 27 isolats a été collecté sur les variétés commercialisées suivantes : Bianca (n=3) (BIA), Bronner (n=3) (BRO), Cabernet carbon (n=1) (CAB), Johanniter (n=2) (JOH), Prior (n=1) (PRI), Regent (n=5) (REG), Solaris (n=5) (SOL) ; ainsi que sur des variétés sensibles (n=10). La majorité des isolats a été collectée dans une parcelle en Suisse. Les isolats VIN, REG ont été collectés en Suisse mais également dans différents pays européens : France, Allemagne, Hongrie et Italie (Tableau 1). Par la suite les isolats seront nommés par un acronyme en fonction de leur plante-hôte d'origine : isolats collectés sur des variétés résistantes : RES ; sur

des variétés sensibles (*V. vinifera*) : VIN ; sur Bianca : BIA ; sur Bronner : BRO ; sur Cabernet carbon : CAB ; sur Johanniter : JOH ; sur Prior : PRI ; sur Regent : REG ; sur Solaris : SOL.

*Mise en collection.* Les feuilles infectées collectées sur le terrain ont été rincées à l'eau et placées dans une boite de pétri avec du papier filtre humide dans une chambre de culture pendant une nuit dans le but d'obtenir une nouvelle sporulation. Chaque isolat est issu de la sporulation d'une unique lésion bien individualisée. Les lésions présentant une forte quantité de sporanges ont été incisées afin d'obtenir de fines bandelettes de feuilles. Les bandelettes ont été placées durant sept heures dans un dessiccateur afin d'atteindre un taux d'humidité compris entre 20% et 30%. Après une nuit à -20°C, les isolats ont été placés dans un cryoconservateur.

Isolat Name	Host plant of origin	Host resistance	Collecting	Country	City
PV365	Bianca	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV366	Bianca	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV367	Bianca	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV368	Bianca	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
SL	Bianca	Resistant		Czech Republic	Lednice
PV369	Prior	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV375	Johanniter	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV376	Johanniter	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV377	Bronner	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV378	Bronner	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV416	Bronner	Resistant	05/10/10	Switzerland	Cugnasco
PV387	Solaris	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV388	Solaris	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV389	Solaris	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV390	Solaris	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV419	Solaris	Resistant	05/10/10	Switzerland	Cugnasco
PV417	Cabernet Carbon	Resistant	05/10/10	Switzerland	Cugnasco
PV13	Regent	Resistant	09/06/08	France	Latresne
PV91	Regent	Resistant	30/06/08	Germany	Pfaffenweiler
PV115	Regent	Resistant	04/08/08	France	Colmar
PV125	Regent	Resistant	02/09/08	Hungary	Pècs
PV412	Regent	Resistant	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV257	Muscadelle	Susceptible	04/08/09	France	Listrac
PV329	Muller Thurgau	Susceptible	22/07/10	Germany	Freiburg
PV340	Furmint	Susceptible	10/08/10	Hungary	Tolcsva
PV336	Kékfrankos	Susceptible	10/08/10	Hungary	Eger
PV328	Muller Thurgau	Susceptible	22/07/10	Germany	Freiburg
PV256	Cabernet sauvignon	Susceptible	04/08/09	France	Ludon
PV392	Merlot	Susceptible	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
PV393	Merlot	Susceptible	16/09/10	Switzerland	Cugnasco
SC	Chardonnay	Susceptible		France	Colmar
SU	Chardonnay	Susceptible		Italy	Udine

Tableau 1 : Liste des isolats utilisés au cours des différentes expériences. [Table 1 : List of isolates used in the different experiments.]

# Tests de pathogénicité

*Préparation des inocula*. Les sporanges de chaque isolat ont été extraits de l'azote liquide et mis en suspension dans 600 µl d'eau stérile. Des gouttes de 20 µl ont été déposées sur la face abaxiale des feuilles de Cabernet sauvignon préalablement rincées à l'eau stérile et placées en survie sur du papier filtre humide dans des boites de Pétri. Après incubation durant une nuit à 21°C dans le noir, les gouttes ont été retirées et les feuilles ont été mises à incuber en chambre de culture à 21°C avec une photopériode de 16h jour/8h nuit. Sept jours après inoculation, les sporanges ont été mis en suspension dans 10 ml d'eau. Après quantification de chaque inoculum avec un compteur de cellules (Scepter counter, Millipore), chacun a été dilué afin d'obtenir une concentration finale de 20 000 sporanges/ml pour les expériences de la partie 2.3.1, et 10 000 sporanges/ml pour les expériences de la partie 2.3.2. Les inocula ont ensuite été maintenus momentanément dans la glace afin d'empêcher le relargage des zoospores.

*Inoculations croisées*. Les quatrième et cinquième feuilles de chaque plante ont été prélevées, rincées à l'eau stérile et séchées afin de produire des disques foliaires. Les tests d'inoculations ont été effectués soit par le dépôt de gouttes d'inoculum sur les disques foliaires (expériences de la partie 2.3.1), soit par flottaison des disques foliaires sur l'inoculum (expériences de la partie 2.3.2) nécessitant donc des concentrations finales de sporanges différentes.

Pour les expériences de la partie 2.3.1, des gouttes de 20 µl ont été déposées sur la face abaxiale des disques foliaires reposant sur du papier filtre humide dans des boites de Petri de 9 cm de diamètre. Chaque boite de pétri contenait 10 disques d'une combinaison plante-isolat. Quatre heures après inoculation, les gouttes ont été retirées. Vingt disques foliaires ont été inoculés par combinaison plante-isolat.

Pour les expériences de la partie 2.3.2, la face abaxiale des disques foliaires a été mise directement en flottaison sur l'inoculum à une concentration de 10 000 spores/ml. Après 4 heures de flottaison, les disques ont ensuite été placés sur un papier filtre humide (face adaxiale contre le papier filtre) dans des boites de Petri carrées de 21 cm de côté. Sept disques foliaires ont été inoculés par combinaison plante-isolat. Chaque boite de Petri contenait un disque de toutes les combinaisons plante-isolat.

Après séchage des disques foliaires, les boites de Petri ont été scellées et mises en incubation à 21°C avec une photopériode de 16h jour/ 8h nuit. En parallèle, chaque isolat a été inoculé sur une feuille de cabernet sauvignon afin d'effectuer des tests moléculaires.

*Notations*. Des notations visuelles d'apparition de nécroses (réaction hypersensible de la plante) et du pourcentage de recouvrement (sévérité) de la feuille ont été effectuées tous les jours entre 2 et 6 jours après l'inoculation. De plus, pour la deuxième expérience de la partie 2.3.2, chaque disque foliaire a été pris en photo tous les jours pendant la durée de l'expérience. La quantité de sporanges présents sur chaque disque foliaire a été mesurée par le biais d'une méthode d'analyse d'images développée par Peressotti *et al.* (2011) implémentée sur le logiciel Image J. Cette analyse a permis d'obtenir la dynamique d'apparition des sporanges au cours du temps pour chaque disque foliaire. Compte tenu de la rapidité de croissance de *P. viticola* dans nos conditions expérimentales, il est difficile d'accéder de manière précise au temps de latence. Cependant, la comparaison des taux de sporulation à un moment précoce de l'infection (4 jours après infection) permet d'accéder au temps de latence. Enfin, l'aire sous la courbe de maladie (AUDPC, Area Under Disease Progress Curve) a été calculée.

Toutes les expériences ont été arrêtées six jours après inoculation. La sporulation finale a été évaluée à l'aide d'un compteur de particules (Beckman Coulter) en récoltant les sporanges à la surface des disques foliaires (comme décrit précédemment dans le chapitre 1) (une mesure pour 10 disques pour les expériences de la partie 2.3.1, et une mesure par disque pour les expériences de la partie 2.3.2). Cette quantification par le compteur de particules a également permis d'obtenir la distribution de la taille des sporanges. Pour chaque disque foliaire, la moyenne pondérée de la taille des sporanges a été calculée ainsi que la variance encadrant cette moyenne.

*Analyse des données*. Dans un premier temps, les données de quantification de sporanges six jours après infection (jai) ont été analysées selon une ANOVA incluant les effets de la plantehôte d'origine, de la plante inoculée, et des répétitions. L'effet 'isolat' a été traité comme un effet aléatoire compris dans l'effet 'plante d'origine'. Puis, la sporulation finale des isolats RES et la moyenne des isolats VIN ont été comparées sur la variété résistante d'origine et sur la variété sensible selon un modèle linéaire généralisé suivi d'un test de comparaison deux à deux de Tukey. De plus, la sporulation à 4 jai est comparée entre les isolats RES et VIN en interaction avec la variété sensible. Une analyse en composante principale (ACP) a été effectuée en incluant l'ensemble des paramètres mesurés. L'ensemble des tests statistiques a été effectué à l'aide du package ade4 (Thioulouse *et al.* 2007) sous le logiciel R v.2.15.0 (R Development Core Team, 2008).

#### **Caractérisation moléculaire**

*Extraction d'ADN et amplification PCR.* Pour chaque isolat utilisé dans les expériences d'inoculations, un disque foliaire présentant des sporanges a été prélevé avant et après l'expérience. Après lyophilisation, l'ADN de chaque disque a été extrait selon la méthode standard au cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB), phenol-chloroform. Les mix et les programmes PCR pour les 40 locus ont été effectuées selon le protocole indiqué dans la partie traitant du développement des marqueurs microsatellites (Partie 1.2.1), comprenant un seul locus par mix.

*Génotypage*. Les produits PCR correspondant aux 40 locus différents d'un même isolat ont été assemblés en 8 mélanges en fonction des fluorophores utilisés afin d'obtenir une dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  de chaque loci. Un microlitre de chaque mélange a été ajouté à 9 µl de formamide et de marqueurs de taille (dilution finale de chaque locus au  $1/100^{\text{ème}}$ ) et analysé dans un séquenceur capillaire (Applied Biosystems 3130) selon le protocole décrit précédemment (Partie 1.2.1). Les électrophorégrammes ont été analysés avec le logiciel GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems, Californie, USA) afin d'assigner les allèles de chaque isolat (Annexe 4).

*Analyse génétique*. Sur la base des combinaisons alléliques, chaque isolat a été assigné à un génotype multilocus (GML) avec un seuil de différence de zéro (seul les isolats avec des allèles identiques à chaque locus ont été groupés dans un même GML) en utilisant le programme GENODIVE (Meirmans et Van Tienderen, 2004). Un arbre de Neighbor-Joining basé sur la distance calculée à partir du nombre d'allèles partagés entre les GML (Distance Allele Shared, Chakraborty et Jin, 1993) a été construit avec le programme Population (Langella, 1999).

Les isolats ont été groupés sur la base de leur génotype et sans *a priori* sur leur population d'origine à l'aide du package 'adegenet' (Jombart, 2008) sous R v.2.15.0 (R Development Core Team, 2008). Après inférence du nombre le plus vraisemblable de groupes (Bayesian information criterion), et assignation de chaque isolat aux différents groupes obtenus, une analyse discriminante en composante principale a été effectuée. Dans l'analyse, huit composantes principales ont été retenues dans l'étape de transformation des données, ce qui correspond à 80% du total de la variabilité génétique.

# 2.3. Résultats

2.3.1 Evaluation de la virulence et de l'agressivité d'isolats face à un panel de génotypes à résistances connues



Figure 1 : Plan d'expérience des inoculations effectuées pour évaluer la virulence et l'agressivité des isolats de mildiou face à un panel de résistances de la vigne. Pour chaque expérience sont indiqués les isolats de mildiou utilisés (nombre d'isolats et plante-hôte d'origine), et les plantes inoculées. Pour les isolats collectés sur les variétés sensibles, la plante-hôte est indiquée par *V. vinifera*.

[Figure 1 : Experimental design of the different inoculations performed to evaluate the virulence and aggressiveness of downy mildew isolates towards grapevine resistances. For each experiment are indicated isolates used (number of isolates followed by the host of origin), and inoculated hosts. For isolates collected on susceptible varieties, the host plant is indicated by V. *vinifera*.]

Des observations expérimentales acquises au laboratoire suggéraient que des isolats de *P. viticola* prélevés sur la variété Regent seraient capables de contourner la résistance présente dans cette variété (*Rpv3*). Pour aborder cette question, deux isolats collectés sur Regent et un isolat collecté sur Bianca (dont le contournement a déjà été démontré) ont été comparés à un isolat collecté sur *V. vinifera* en les inoculant sur un panel de 10 génotypes de vigne composé de variétés sensibles et de variétés dont la résistance est connue (Figure 1A). Cette expérience a été répétée deux fois. Les résultats des deux répétitions sont présentés sur la figure 2. Dans la première répétition l'isolat Pv SL (collecté sur Bianca) ne s'est développé sur aucun génotype de plantes incluant la variété sensible ; et dans la deuxième répétition, c'est l'isolat Pv SC (collecté sur une variété sensible) qui ne s'est pas développé. Ces combinaisons isolat/répétition ne sont donc pas présentées dans la figure 2. Le niveau global de sporulation est plus faible dans la première répétition que dans la deuxième. Cependant, la sporulation des isolats Pv13 et Pv125 (collectés sur Regent) dans les deux expériences présente les mêmes tendances (Figure 2).



Figure 2 : Nombre de sporanges produits 6 jours après inoculation en fonction de l'isolat et de la plante-hôte pour les expériences 1a (A) et 1b (B). Les barres correspondent à la moyenne +/-SEM de deux boites de petri.

[Figure 2 : Sporangia number produced 6 days post inoculation depending on isolate and host plant for experiment 1a (A) and 1b (B). Bars indicate mean +/- SEM of two pétri dishes.]

Afin de découpler l'effet géographique de l'effet plante-hôte d'origine, le nombre d'isolats a été augmenté afin d'avoir 2 isolats collectés sur chaque plante-hôte provenant de zones géographiques différentes (Figure 1B). Les expériences n'ont pas très bien fonctionnées mais nous permettent de faire une analyse des nécroses en tenant compte de toutes les expériences (Tableau 3).

Tableau 3: Quantification des nécroses par interaction isolat / plante-hôte. Pour chaque interaction, le nombre de + dépend de la quantité de disques foliaires d'une interaction présentant des nécroses sur l'ensemble des expériences 1A et 1B : + : 25-50%, ++ : 50-75%, +++ : >75%.

[Table 3 : Necrosis quantification for each interaction isolate / host plant. For each interaction, the number of + depends on quantity of leaf discs per interaction presenting necrosis among all the experiments 1A and 1B : + : 25-50%, ++ : 50-75%, +++ : >75%.]

	V. vi	nifera	Reger	nt	Bian	ca
	SC	Pv329	Pv13	Pv125	SL	Pv365
Muscat Ottonel						
Cabernet sauvignon						
18-030						
18-008	+++	+++	++	+		
Bianca	+++	+++	++	+		
Regent	+++	+++				
7001H	+++	+++	++	++	++	++
7050H	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Vitis rupestris	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Vitis riparia	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Les résultats des expériences 1A et 1B sont présentés ci-dessous en les détaillant selon le type de plante inoculée.

*Sur les variétés sensibles*. Les isolats REG et BIA conduisent à un niveau de sporulation au moins aussi important que l'isolat Pv SC sur les variétés sensibles (Figure 2). Même s'il existe des différences entre les expériences 1a et 1b pour la variété 18-030 (individu du croisement Chardonnay x Bianca, sans le QTL *Rpv3*), les isolats se comportent sur celle-ci comme sur une variété sensible. On peut noter que sur Cabernet sauvignon et 18-030, les isolats REG (et par extrapolation BIA) se développent plus que l'isolat Pv SC. Sur ces variétés, aucune nécrose n'a été observée (Tableau 3).

*Sur les variétés avec le QTL Rpv3*. Sur les variétés Regent, Bianca et 18-008 (individu du croisement Chardonnay x Bianca, avec le QTL *Rpv3*), les isolats VIN produisent une quantité faible de sporanges s'accompagnant systématiquement de nécroses. Concernant les isolats REG et BIA, leur sporulation est aussi importante que sur les variétés sensibles (Figure 2). Sur Regent, aucun de ces isolats n'entraine l'apparition de nécroses. Sur Bianca et 18-008, les isolats BIA ont une sporulation plus importante que les isolats REG. Sur ces mêmes variétés, la sporulation des isolats REG est accompagnée dans 25 à 50% des cas par l'apparition de nécroses (Tableau 3).

Sur les variétés avec d'autres QTL de résistance. Sur l'espèce V. riparia (Rpv6, Rpv9, Rpv13) et le génotype 7050H (Rpv2), aucune sporulation n'est obtenue quelque soit l'isolat considéré. De plus, sur ces plantes-hôtes, deux jours après inoculation, des nécroses apparaissent. Sur
7050H, les nécroses apparaissent de manière beaucoup plus intense avec les isolats REG et BIA qu'avec les isolats VIN. Sur le génotype 7001H (*Rpv1*) et *V. rupestris*, les isolats produisent une sporulation plus faible que sur les variétés sensibles et s'accompagne d'un niveau élevé de nécroses. Sur 7001H l'intensité des nécroses est légèrement plus faible pour les isolats REG et BIA que pour les isolats VIN (Figure 2, Tableau 3).

2.3.2 Evolution de l'agressivité d'isolats face à des résistances quantitatives de variétés commercialisées



Figure 3 : Plan d'expérience des inoculations effectuées pour évaluer l'adaptation des isolats de mildiou face aux résistances de la vigne. Pour chaque expérience sont indiqués les isolats de mildiou utilisés (nombre d'isolats, plante-hôte d'origine) et les plantes inoculées. Pour les isolats collectés sur les variétés sensibles, la plante-hôte est indiquée par *V. vinifera*.

[Figure 3 : Experimental design of the different inoculations performed to evaluate adaptation of downy mildew isolates to grapevine resistances. For each experiment are indicated isolates used (number of isolates followed by the host of origin), and inoculated hosts. For isolates collected on susceptible varieties, the host plant is indicated by *V. vinifera*.]

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'évolution de l'agressivité des isolats vis-à-vis des résistances quantitatives de variétés commercialisées. Pour ce faire, des isolats collectés sur des variétés résistantes (Bronner, Bianca, Solaris, Cabernet carbon, Prior, Johanniter et Regent) et sur des variétés sensibles (*V. vinifera*) ont été inoculés sur leur propre plante-hôte d'origine et sur *V. vinifera* cv. Cabernet sauvignon (variété sensible) (Fig 3A). De plus, dans une deuxième expérience, un panel d'isolats légèrement différents a été inoculé sur leur

propre plante-hôte et sur les plantes-hôtes d'origine des autres isolats (variétés résistantes et *V. vinifera*) afin de comparer leur capacité d'infection et leur niveau d'agressivité (Fig 3B)



Figure 3 : Sporulation 6 jours après infection (jai) de chaque isolat sur sa plante-hôte d'origine et sur *V. vinifera* (variété sensible) pour les expériences 2A (A) et 2B (B). Les résultats pour chaque groupe d'isolats collectés sur une variété résistante (BRO, SOL, CAB, JOH, BIA, REG), sont mis en regard des résultats obtenus pour les isolats issus de *V. vinifera*. VIN correspond à la sporulation moyenne des isolats collectés sur *V. vinifera*. Chaque barre d'histogramme correspond à la moyenne des 7 répétitions +/- SEM. Des lettres différentes indiquent une différence significative d'après les comparaisons deux à deux selon un test de Tukey.

[Figure 3 : Sporulation 6 days post incoulation (dpi) of each isolate on its host plant of origin and on *V. vinifera* (susceptible variety) for experiments 2a (A) and 2b (B). Results of isolates grouped by resistant variety of origin (BRO, SOL, CAB, JOH, BIA, REG), are compared to the result obtaines for isolates collected on *V. vinifera*. VIN represents mean sporulation of isolates collected on *V. vinifera*. Each bar represents the mean of 7 replicats +/- SEM. Different letters indicate significant difference from the Tukey pairwise comparison test.]

Avant de détailler les résultats, il faut noter que nous avons trouvé certaines divergences entre les deux expériences: i) les isolats VIN et CAB ne se sont développés sur la variété Cabernet carbon que dans la première expérience ; ii) l'isolat Pv390 (isolat SOL) s'est développé aussi bien sur Solaris que sur *V. vinifera* dans la première expérience et s'est développé

significativement moins sur Solaris que sur *V. vinifera* dans la seconde ; iii) les isolats VIN ne se sont développés sur Johanniter que dans la première expérience.

*Sporulation sur la variété sensible.* Les isolats VIN (prélevés sur les cv sensibles de *V. vinifera*) se sont développés sur *V. vinifera* avec des niveaux différents de sporulation. Comme pour les isolats VIN, les isolats collectés sur les variétés hybrides résistantes (BRO, SOL, CAB, PRI, JOH, REG) se sont développés sur *V. vinifera* avec des niveaux différents de sporulation (Figure 3).

*Sporulation sur la variété résistante d'origine.* Les isolats VIN ne se sont pas (ou peu) développés sur les variétés résistantes (Figure 3). Les isolats RES ont atteint des niveaux de sporulation différents en fonction de leur plante d'origine et de la plante inoculée. De plus, certains d'entre eux sont capables de se développer sur leur variété d'origine (PRI, JOH, REG). Parmi les isolats RES, nous pouvons ainsi distinguer 3 types d'isolats :



- cas 1 : Les isolats qui se sont significativement mieux développés sur *V. vinifera* que sur leur variété résistante d'origine sur laquelle ils n'ont pas ou peu induit de sporulation (BRO, SOL, CAB de l'expérience 2B).

- cas 2 : les isolats pour lesquels il n'y a pas de différence significative de quantité de sporulation entre leur variété d'origine (résistante) et la variété sensible mais avec un niveau plus faible que la moyenne des isolats VIN sur la variété sensible (une partie des isolats BRO et SOL)

- cas 3 : les isolats qui se sont développés aussi bien sur leur variété résistante que sur la variété sensible et aussi bien que les isolats VIN sur la variété sensible. On peut noter que pour certains isolats, le niveau de sporulation est plus important sur la variété résistante que sur la variété sensible mais de manière non significative (PRI, JOH, REG, CAB et 1 isolat SOL de l'expérience 2A).



Figure 4 : Sporulation moyenne (6 jai) en fonction de l'hôte d'origine et de l'hôte inoculé. Sporulation des isolats issus d'une même variété sur les différentes variétés (A) et sporulation sur une variété donnée des isolats issus des différentes variétés (B). Chaque barre représente la moyenne +/-SEM des 7 réplicats des n isolats collectés sur la même plante-hôte (le nombre d'isolat est indiqué avec le symbole #). Des lettres différentes indiquent une différence significative d'après les comparaisons deux à deux selon un test de Tukey.

[Figure 4 : Mean sporulation (6 dpi) depending on host of origin and inoculated host. Sporulation on the different varieties of isolates collected on the same host plant (A), and sporulation on one variety of isolates collected on different varieties (B). Each bar represent the mean value +/- SEM of the seven replicates of the n isolates collected on the same host plant (n is indicated following #). Different letters indicate significant difference from the Tukey pairwise comparison test.]

*Sporulation sur les autres variétés résistantes.* Les isolats BRO, SOL et CAB se développent peu sur les autres variétés résistantes utilisées dans cette expérience. Cependant, les isolats PRI, JOH et REG (qui présentent une forte agressivité sur leur variété résistante d'origine) se développent sur plusieurs autres variétés résistantes (Cabernet carbon, Prior, Johanniter et Regent), et ce avec le même niveau de sporulation que sur la variété sensible. De plus, l'isolat PRI se développe sur la variété Solaris (Figure 4).

A ce point, il est important de noter que sur les deux expériences, sur la variété sensible, les isolats RES produisent une quantité finale de sporanges significativement plus importante que les isolats VIN. De plus, dans la deuxième expérience, nous pouvons voir que les isolats RES produisent plus de sporanges que les isolats VIN, dès l'apparition des premiers sporanges, 4 jours après l'inoculation (Figure 5).



Figure 5 : Sporulation mesurée 4 jai (expérience 2b) et 6 jai (expérience 2a) sur *V. vinifera* en fonction de l'origine des isolats : variétés résistantes (RES) ou sensible (VIN). Chaque barre représente la moyenne des 7 réplicats des n isolats de la même origine (13 RES et 7 VIN pour (A), 17 RES et 6 VIN pour (B)). Les effets significatifs selon l'analyse de variance sont indiqués par les astérisques (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; and \*\*\*, P < 0.001).

[Figure 5 : Sporulation mesured 4 dpi (experiment 2b) and 6 dpi (experiment 2a) on *V. vinifera* depending on the origin of isolates : resistant variety (RES) or susceptible variety (VIN). Each bar represents the mean o 7 replicats of n isolates coming from the same origin (13 RES and 7 VIN for (A), and 17 RES and 6 VIN for (B)). The statistically different effects of analysis of variance are indicated by asterisks (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; and \*\*\*, P < 0.001).]

*Traits de vie impliqués.* De manière globale, la quantité de sporanges produits 6 jours après inoculation dépend à la fois de la plante d'origine des isolats, de la plante inoculée et de l'interaction entre la plante d'origine et la plante inoculée (Tableau 4).

Tableau 4: Analyse de variance de la sporulation finale des isolats de *P. viticola* de l'expérience 2B. Les sources de variation testées sont la plante d'origine des isolats, la plante inoculée, et l'interaction entre ces deux paramètres.

[Table 4: Analysis of variance of final sporulation of *P. viticola* isolates in the experiment 2B. Sources of variation are the 'host-plant of origin', the 'inoculated host-plant' and the interaction between these variables.]

	Sum Sqares	Df	F value	P (> F)
Inoculated host	$7.14*10^{12}$	6	81.749	$< 10^{-16}$
Host of origin	$7.89*10^{12}$	6	90.371	$< 10^{-16}$
Inoculated host : Host of origin	$8.94*10^{12}$	36	17.073	$< 10^{-16}$
Residuals	$1.35*10^{13}$	931		

Une analyse en composante principale (ACP) a été effectuée en incluant l'ensemble des paramètres mesurés. Les axes de l'ACP sont représentés sur la figure 6, ainsi que la distribution de chaque disque foliaire sur ces axes en fonction de la plante d'origine des isolats, de la plante inoculée et de l'isolat. Les résultats de l'ACP indiquent que la quantité finale de sporanges produits est corrélée à la quantité de sporanges mesurée par l'analyse

d'images à 3, 4, 5 et 6 jai, ainsi qu'aux AUDPC correspondantes. Les notations visuelles de pourcentage de recouvrement du disque foliaire sont toutes corrélées entre elles. De plus, l'ACP indique que plus la quantité de sporanges produits est importante, plus la taille des sporanges diminue et devient homogène. En effet, la variance autour du diamètre moyen est inversement corrélée à la quantité de sporanges produite (Figure 6).



Figure 6 : Analyse en composante principale effectuée en incluant l'ensemble des paramètres mesurés : la quantité de sporanges à 6 jai (Spo f, mesurée au compteur de particules), le diamètre des sporanges (Diam), la variance de la taille des sporanges (Var Diam), la sévérité de 3 à 6 jai (Sev, notation visuelle de pourcentage de recouvrement des sporanges), la sporulation de 3 à 6 jai (Spo, quantifiée par l'analyse d'images), et l'AUDPC à 4, 5 et 6 jai (auc).

[Figure 6 : Principal component analysis including all parameters mesured : total number of sporangia at 6 dpi (Spo f, mesured by cell counter), sporangia diameter (Diam), sporangia size variance (Var Diam), severity from 3 to 6 dpi (Sev, visual notation of percent of spread of sporangia), porulation from 3 to 6 dpi (Spo, quantified by image analyses), and AUDPC at 4, 5 and 6 dpi (auc).]



Figure 7 : Taille des sporanges en fonction du nombre de sporanges produits sur *V. vinifera* pour les expériences 2A (A) et 2B (B). Les couleurs indiquent l'origine des isolats : isolats collectés sur une variété résistante (RES) ou collectés sur une variété sensible (VIN).

[Figure 7 : Sporangia size depending on quantity of sporangia produced on *V. vinifera* for experiment 2A (A) and 2B (B). Colors indicate the isolates origin: isolates collected on resistant variety (RES) or collected on susceptible variety (VIN).]

Les variations de taille des sporanges sont également observables sur la figure 7. Sur *V. vinifera*, plus le nombre de sporanges produits est important, plus les sporanges sont petits. Cette diminution est observable à la fois pour les isolats collectés sur des variétés sensibles et sur des variétés résistantes. On peut noter que globalement le nombre de sporanges produits dans l'expérience 2A est plus faible que le nombre de sporanges produits dans l'expérience 2B (Figure 3). Par conséquent, les sporanges sont plus petits dans l'expérience 2B que l'expérience 2A (Figure 6).

#### 2.3.3 Caractérisation moléculaire et phylogénétique

Les isolats utilisés pour les inoculations croisées ont été génotypés à l'aide de 40 marqueurs microsatellites. Le jeu de données ne comprend aucune donnée manquante. L'analyse génotypique n'a pas révélé la présence de génotypes répétés dans le jeu de données (il n'y aurait pas de clones). Sur les 40 locus, 15 se sont révélés monomorphes au sein de la population étudiée.

La classification des isolats, effectuée avec l'analyse discriminante en composante principale sur les génotypes des isolats, indique l'existence de 3 groupes distincts (Figure 8A). Ces trois groupes sont également observables dans l'arbre de neighbor-joining basé sur la distance calculée à partir du nombre d'allèles partagés entre les isolats (Figure 8B). Le premier axe de l'ACP sépare les isolats selon un critère géographique. Les isolats du groupe 1 ont été collectés en France, en Allemagne et en Hongrie alors que les isolats des groupes 2 et 3 ont été collectés en Italie et principalement en Suisse (Figure 9A). Le deuxième axe de l'ACP sépare les isolats du groupe 2 des isolats du groupe 3 selon un critère d'agressivité sur les variétés résistantes. En effet, les isolats du groupe 2 se développent peu ou pas sur les variétés résistantes alors que les isolats du groupe 3 ont une agressivité élevée en moyenne sur l'ensemble des variétés résistantes (Figure 9B).



Figure 8 : Structure génétique des isolats utilisés dans les expériences. (A) Résultat de l'analyse discriminante en composantes principales (dACP) effectuée sur les génotypes des isolats. (B) Arbre de Neighbor-Joining basé sur la distance calculée à partir du nombre d'allèles partagés aux 40 locus entre les isolats. Dans les deux figures, les couleurs indiquent les différents groupes identifiés par la dACP.

[Figure 8 : Genetic structure of isolates used in the experiments. (A) Result of the discriminant principal component analysis (dPCA) performed on genotype of isolates. (B) Neighbor-Joining tree based on distance calculated from the number of alleles shared on the 40 locus between isolates. In both figures, colors indicate the different clusters identified by the dPCA.]



Figure 9 : Lien entre les groupes génétiques, la géographie, la plante d'origine et l'agressivité des isolats. (A) Résultats de la dAPC sur laquelle a été identifiée l'information géographique des isolats (pays d'origine) et (B) la plante-hôte d'origine des isolats. La taille des disques est proportionnelle à la sporulation obtenue pour l'isolat considéré sur les plantes résistantes.

[Figure 9 : Link between genetic clusters, geography, host plant and isolates aggressivity. (A) Results of dPCA on wich has been incorporated geographic information of isolates (country of origin) and (B) host plant of origin of isolates. Disc size is proportional to the sporulation of the isolate on resistant varieties.]

# 2.4. Discussion

#### **Contournement des résistances**

Le contournement des résistances partielles a pu être mis en évidence pour les variétés Regent, Johanniter et Prior. Il a été proposé récemment que la résistance de Regent et Bianca pourrait être conférée par un seul et même QTL, le QTL *Rpv3* (Schwander *et al.* 2012). Ce QTL majeur confère une résistance partielle au mildiou de la vigne puisque l'ensemble des isolats se développe sur ces deux variétés. Nos résultats confirment qu'il s'agit bien d'un même QTL puisque les isolats de Bianca (BIA) et de Regent (REG) se comportent de manière similaire sur les deux variétés. Cependant, il est important de noter que les isolats contournant Regent provoquent parfois une réaction hypersensible sur Bianca, indiquant que la variété Bianca pourrait contenir d'autres gènes de résistance qui ont eux aussi été contournés par les isolats BIA qui ne provoquent pas de réaction hypersensible. De plus, les isolats issus de Johanniter et de Prior se développent non seulement sur leur plante d'origine mais aussi sur Regent. Di Gaspero *et al.* (2012) ont montré que les allèles conférant la résistance au mildiou au niveau du QTL *Rpv3* sont largement répandus dans les variétés résistantes cultivées. Il est donc possible que les variétés Johanniter et Prior aient hérité de ce QTL majeur de l'un de

leur ancêtre, Seibel 6468 et Seyval respectivement. Dans ce cadre, les isolats qui contournent la résistance de Regent, Johanniter, Bianca et Prior ne seraient pas spécialistes d'une variété particulière mais du gène majeur *Rpv3* présent dans ces quatre variétés. Il a été montré que *Rpv3* co-localise avec un cluster de gènes NBS-LRR, ce qui suggère qu'une protéine NBS-LRR pourrait être responsable de la résistance dérivée de Bianca (Bellin *et al.* 2009). Les gènes NBS-LRR constituent la classe la plus fréquente de gènes de résistance codés par les plantes (voir introduction générale). Comme cela a été proposé pour les isolats contournant la variété Bianca (Peressotti *et al.* 2010), il semble probable qu'il s'agisse d'une interaction R-Avr et que l'émergence d'isolats contournant soit causée par un changement dans le gène Avr correspondant au locus *Rpv3*.

Nous n'avons pas observé de contournement de la résistance de Bronner, Solaris et Cabernet carbon. Ces trois variétés ont toutes une généalogie proche : Solaris et Bronner sont des « <sup>3</sup>/<sub>4</sub> de frères » et Cabernet carbon est un descendant de Bronner. Il est donc possible que le QTL de résistance majeur identifié dans la variété Bronner (*Rpv10*) (Blasi 2010) et également présent dans la variété Solaris (Schwander *et al.* 2012) soit aussi présent dans la variété Cabernet carbon. Deux études ont montré l'importance du fond génétique sur le contournement de résistance indiquant que l'association de résistances quantitatives à un gène de résistance R permet d'empêcher l'apparition d'isolats virulents (Palloix *et al.* 2009, Brun *et al.* 2010). Il est possible que la résistance partielle majeure apportée par le QTL *Rpv10* soit associée à d'autres résistances partielles à effets faibles dans les variétés Solaris et Bronner.

Une question importante qui se pose suite à la mise en évidence de ces contournements est de savoir s'il s'agit d'un événement unique ou bien d'évènements répétés de controunement ayant eu lieu dans différentes parcelles. L'analyse génétique des isolats utilisés dans nos expérimentations a mis en évidence une différentiation des populations suivant un axe nordsud qui correspond à la barrière des Alpes. Au sein de la parcelle Suisse (Sud des Alpes), les isolats contournant le QTL Rpv3 (PRI, JOH, REG) forment un groupe monophylétique dans l'arbre de Neighbor-Joining indiquant qu'ils sont très proches génétiquement. Les contournements de Prior, Johanniter et Regent observés dans cette parcelle pourraient donc résulter d'un évènement unique de mutation. Ce résultat renforce donc l'hypothèse selon laquelle ces variétés possèderaient toutes le même QTL majeur de résistance au mildiou (Rpv3). Au Nord des Alpes, les isolats virulents sur Regent ne constituent pas de groupe génétique bien différentié. Il faut rappeler que les isolats collectés sur cette variété proviennent de différentié. Il faut rappeler que les isolats collectés sur cette variété proviennent de différents vignobles distants de plusieurs centaines de kilomètres (Suisse, Hongrie, Allemagne et France). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les contournements de Regent résultent d'adaptations locales répétées.

Dans les expériences décrites dans la partie 2.3.2, nous avons observé certaines incohérences entre les deux répétitions. En effet, certains phénotypes n'ont pas pu être reproduits entre les différentes expériences. L'isolat Pv390 (Solaris), virulent sur Solaris dans l'expérience 2A, ne l'était plus dans l'expérience 2B. En dehors de probables problèmes expérimentaux, plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat : ceci pourrait être lié à un coût de fitness associé à la virulence. Dans ce cas, la virulence pourrait avoir été perdue suite aux différents repiquages effectués sur une variété sensible entre les 2 expériences. Une autre hypothèse repose sur le niveau d'expression de la résistance dans les plantes : en effet, nous ne pouvons pas exclure des différences de sensibilité des feuilles au mildiou entre les 2 années même si les plants utilisés provenaient tous de la même pépinière et que les feuilles ont été prélevées au même moment après le débourrement.

Pour Cabernet carbon, il se peut que des conditions non contrôlées dans nos expériences influencent sa résistance. En effet, dans la première expérience, l'isolat collecté sur Cabernet carbon et les isolats collectés sur *V. vinifera* permettaient d'obtenir une sporulation d'un niveau identique à la moyenne alors que dans la seconde expérience, aucun de ces isolats n'a pu conduire à la production de sporanges. Ce résultat suggère que la résistance de Cabernet carbon serait sensible à des variations développementales ou environnementales pouvant induire des niveaux de résistance de la plante différents (Pariaud *et al.* 2009).

## Erosion de la résistance quantitative et évolution de l'agressivité

Sur la variété Bronner, nous observons une augmentation de la sporulation des isolats collectés sur Bronner et Solaris par rapport aux isolats collectés sur les cultivars sensibles de *V. vinifera*. Ceci montre que, bien que le QTL majeur *Rpv10* ne soit pas contourné, il y a érosion significative de la résistance des variétés Bronner et Solaris se manifestant par une augmentation de l'agressivité des isolats. De plus, sur *V. vinifera* et sur l'ensemble des variétés résistantes, le niveau d'agressivité des isolats collectés sur les variétés résistantes (qu'il y ait eu contournement ou érosion de la résistance) est significativement plus élevé que celui des isolats collectés sur les variétés sensibles. On peut donc voir que l'érosion observée n'est pas spécifique d'un QTL en particulier. Différents QTL ont pu entrainer la sélection

d'isolats possédant les mêmes traits phénotypiques. Ce type de comportement généraliste correspond bien au phénomène d'érosion. Ces résultats sont en accord avec le modèle développé par Gandon et Mickalakis (2000) qui prédit une augmentation de l'agressivité des parasites en réponse à la résistance quantitative de l'hôte. De même, les isolats collectés sur Bianca, Regent et Prior sont plus agressifs sur leur plante-hôte d'origine que des isolats avirulents sur les variétés sensibles. Ceci montre que, sur les variétés résistantes, le contournement de la résistance s'accompagne d'une augmentation de l'agressivité par rapport au niveau d'agressivité moyen d'isolats avirulents.

L'agressivité est la résultante de différents traits de vie et de l'interaction entre ces traits qui répondent de manière différentielle à la sélection par les résistances partielles de l'hôte. En effet, les stratégies d'adaptation des parasites peuvent différer entre les variétés (et par extension, entre les résistances). La recherche des traits impliqués dans l'adaptation des parasites est donc importante pour déterminer quelles étapes du cycle de vie sont contraintes par la plante-hôte. La sporulation (quantité de sporanges produits) est la composante principale de l'agressivité. Elle constitue la capacité de transmission du pathogène. Comme évoqué précédemment, l'utilisation des variétés à résistance majeure ou mineure a conduit à la sélection d'isolats ayant une capacité de sporulation plus forte à la fois sur leur plante-hôte d'origine et sur les plantes sensibles. Cette augmentation de la sporulation semble être corrélée à une diminution du temps de latence. Compte tenu de la rapidité de croissance de P. viticola dans nos conditions expérimentales, il est difficile d'accéder de manière précise au temps de latence de chacun des isolats. Cependant, au moment de l'infection précoce (4 jai), sur la variété sensible, les isolats collectés sur les variétés résistantes produisent plus de sporanges que les isolats collectés sur les variétés sensibles. Ces isolats sont donc probablement plus rapides que les autres et augmentent ainsi le nombre de cycles asexués réalisables au cours d'une saison.

Nos résultats ont également permis de révéler l'existence d'un « trade-off » entre le nombre et la taille des sporanges : plus les isolats produisent de sporanges, plus ils sont petits. Smith et Fretwell (1974) ont, les premiers, modélisé la corrélation négative qui existe entre le nombre de descendants et l'investissement dans chacun de ses descendants. Le modèle classique de Smith et Fretwell montre que pour un individu ayant une ressource finie à partager entre ses descendants, le nombre de descendants qu'il peut produire est inversement proportionnel à l'investissement dans chacun des descendants (approximé par la taille des descendants). Ce « trade-off » a depuis été retrouvé chez de très nombreuses espèces animales et végétales

(Stearns 1992, Roff 2002). L'évolution des stratégies reproductives des parasites n'échappe pas à la règle et Poulin (1995) a montré qu'on retrouvait bien ce pattern pour des parasites de poissons. A notre connaissance, nos données sont les premières à montrer que cette relation s'applique aussi aux pathogènes de plantes. L'augmentation du nombre de sporanges produits par les isolats RES (adaptés aux variétés résistantes) pourrait être une stratégie pour augmenter leur capacité de dispersion. En effet, les plantes de vigne résistantes constituent une niche vacante pour les pathogènes qui pourrait favoriser les génotypes de mildiou de type 'disperseur' (faisant plus de spores). Une autre hypothèse est que cette stratégie permet d'augmenter les capacités de colonisation des tissus de la feuille au moment de l'infection (propagules plus nombreuses).

Nos données montrent que la sévérité et le nombre final de sporanges ne sont pas corrélés. Il est difficile d'interpréter la sévérité en terme de traits d'histoire de vie du pathogène, mais on pourrait par exemple considérer que ces pourcentages de recouvrement sont un proxy de la surface de feuille colonisée par le mycélium interne du pathogène. On observe ainsi que la production de mycélium varie en fonction des variétés et/ou des isolats : certains isolats semblent produire beaucoup de mycélium et peu de sporanges en fin de cycle infectieux, tandis que d'autres semblent produire peu de mycélium et beaucoup de sporanges en fin de cycle. C'est notamment le cas de l'isolat Pv389 (BRO) qui présente sur Bronner et sur Solaris une sévérité moyenne mais une sporulation finale faible. Si nous voulons pouvoir aller plus loin dans l'analyse des ces traits, il apparait nécessaire de mettre au point une nouvelle technique pour évaluer le mycélium produit en réalisant par exemple une analyse histologique au cours de l'infection.

Un parallèle est souvent fait entre fitness et agressivité, cependant, elles ne peuvent être considérées comme équivalentes. En effet, afin d'améliorer l'estimation de la fitness, des traits d'histoire de vie comme la viabilité des spores et la survie inter-annuelle (liée à la reproduction sexuée) devraient être pris en compte (Pariaud *et al.* 2009). Ainsi, afin de mieux caractériser les différentes stratégies évolutives des pathogènes de plantes, il serait nécessaire d'évaluer la valeur sélective (fitness) d'un isolat.

- Chapitre 2 : Evolution des populations de mildiou face aux résistances de la vigne -

dentification et caractérisation d'effecteurs candidats de Plasmopara viticola impliqués dans la virulence<sub>109</sub>

Ch

3

- Chapitre 3 : Identification et caractérisation d'effecteurs candidats de Plasmopara viticola impliqués dans la virulence -

# **3.1. Introduction**

Les agents pathogènes manipulent le métabolisme des plantes grâce à l'utilisation de protéines sécrétées nommées effecteurs, notamment en inhibant le système immunitaire de l'hôte. Le séquençage des génomes d'oomycètes pathogènes de plantes tels que Albugo candida (Kemen et al. 2011), Albugo laibachii (Links et al. 2011), Hyaloperonospora arabidopsidis (Baxter et al. 2010), Phytophthora infestans (Haas et al. 2009), Phytophthora sojae (Tyler et al. 2006), Phytophthora ramorum (Tyler et al. 2006), Pseudoperonospora cubensis (Tian et al. 2011), Pythium ultimum (Lévesque et al. 2010) ont permis d'identifier des répertoires d'effecteurs sécrétés. Deux types majoritaires de protéines transloquées dans les cellules de l'hôte ont été identifiés : les effecteurs de type RxLR et de type Crinkler (cf. Introduction générale). Ces protéines, potentiellement nécessaires au pouvoir pathogène, peuvent être reconnues par les protéines de résistance de la plante et conduire à l'arrêt du développement de l'agent pathogène. Des variations dans le répertoire des effecteurs des agents pathogènes leur permettent de surmonter les résistances présentes au sein de leur hôte, comme dans le cas des contournements de résistance. De plus, Schulze-Lefert et Panstruga (2011) ont postulé que quelques modifications dans le répertoire d'effecteurs de l'agent pathogène pourraient suffire à s'adapter à une espèce végétale étroitement liée. Ainsi, ces variations semblent dicter des changements dans la gamme d'hôtes des agents pathogènes, ce qui peut conduire à un isolement reproductif et la spéciation ultérieure de l'agent pathogène (Schulze-Lefert et Panstruga 2011). En outre, les agents pathogènes avec un répertoire large et diversifié d'effecteurs doivent avoir une plus grande chance d'augmenter leur gamme d'hôtes (Schulze-Lefert et Panstruga 2011).

Le régime et l'intensité de la sélection auxquels les gènes sont soumis sont déterminés en utilisant des méthodes basées sur l'analyse des taux de mutations synonymes ( $d_N$ ) et le calcul du rapport  $d_N/d_S$  (Aguileta *et al.* 2009). Lorsque la sélection est neutre, le taux de fixation de mutations synonymes et non-synonymes est identique au cours de l'évolution ( $d_N/d_S = 1$ ). L'élimination ( $d_N/d_S = 0$ ) ou la limitation ( $d_N/d_S < 1$ ) des mutations non-synonymes au cours de l'évolution du fait de leur effet négatif ou délétère, indiquent qu'une sélection purifiante agit sur le gène considéré. Au contraire, une accumulation de mutations non-synonymes ( $d_N/d_S > 1$ ) du fait de leur effet favorable, indique qu'une sélection positive agit sur le gène considéré. Ces taux de mutations peuvent être calculés au sein d'une espèce où ils reflètent la variation nucléotidique actuelle. Ils peuvent également être calculés

entre espèces en utilisant un outgroup et dans ce cas nous informe sur le type de sélection qui s'est produit au cours du temps entre les espèces (Stukenbrock *et al.* 2012).

De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer le type de sélection s'exerçant sur les effecteurs des agents pathogènes. A l'échelle de génomes entiers, il est largement observé qu'une forte sélection positive s'exerce sur les gènes codant pour des effecteurs (Liu *et al.* 2005, Allen *et al.* 2004, Win *et al.* 2007, Raffaele *et al.* 2010). Cependant, le re-séquençage des effecteurs candidats de *P. sojae* a révélé que seulement 10% à 15% d'entre eux montrent des preuves significatives de sélection positive (Wang *et al.* 2011). Par ailleurs, l'analyse transcriptomique des effecteurs a montré qu'un pourcentage relativement faible (environ 10% à 15%) est modérément à fortement transcrit au cours de l'infection (Haas *et al.* 2009, Cabral *et al.* 2011, Wang *et al.* 2011). A l'échelle du gène candidat, des études ont également montré que les effecteurs n'évoluent pas sous sélection neutre : notamment dans le cas du gène d'avirulence Avr4 chez *Cladosporium fulvum* (Stergiopoulos *et al.* 2007), du gène ATR13 chez *H. parasitica* (Allen *et al.* 2004), ou encore du gène d'avirulence AvrL567 chez *Melampsora lini* (Dodds *et al.* 2006).

Dans le chapitre 1, nous avons montré que les populations de mildiou de la vigne se sont adaptées à la diversité de plantes-hôtes notamment avec une expansion de leur gamme d'hôtes des espèces sauvages vers les espèces cultivées. Dans le chapitre 2, nous avons montré que désormais les populations de mildiou de la vigne s'adaptent aux variétés résistantes présentes en Europe. Les répertoires d'effecteurs des agents pathogènes sont potentiellement impliqués dans ces deux évènements d'adaptation des populations de mildiou. C'est dans ce contexte que nous avons posé les questions suivantes :

(1) Est-il possible d'identifier des effecteurs de type RxLR au sein du génome de *P. viticola* ?
(2) Ont-ils été conservés au cours de l'évolution, i.e., y a-t-il eu des délétions de certains gènes candidats ?
(3) Quel type de sélection s'exerce sur ces effecteurs candidats ?

Pour répondre à ces questions, dans un premier temps, nous avons effectué des recherches *in silico* de gènes candidats contenant le motif RxLR à partir de ressources génomiques de *P. viticola* disponibles au sein du laboratoire. Dans un deuxième temps, des tests d'amplifications ont été effectués afin d'identifier le niveau de conservation entre les différents isolats. Enfin, le séquençage des gènes candidats sur une collection d'isolats a permis de mesurer leur taux de mutations et d'identifier les gènes candidats étant sous sélection positive.



Figure 1 : A. Structure en domaines d'une protéine RxLR typique (Avr1b-1). B. Représentation schématique des différentes étapes pour l'identification de gènes RxLR candidats de *P. viticola* : recherche de gènes candidats *in silico*, validation des séquences par des tests d'amplification et de séquençage, et analyse du polymorphisme sur 16 isolats de *P. viticola*.

[Figure 1 : A. Domain structure of a typical RxLR protein (Avr1b-1). B. Schematic representation of the different steps to identify candidate RxLR genes from *P. viticola* : research for candidate genes *in silico*, sequence validation by PCR amplification and sequencing, and polymorphism tests on 16 isolates of *P. viticola*.]

# 3.2. Identification d'effecteurs candidats de P. viticola

## **Ressources génomiques**

Un certain nombre de données de séquençage de *P. viticola* sont disponibles au sein du laboratoire. Dans un premier temps, l'ADNc de zoospores/feuilles infectées a été séquencé pour deux isolats (SC, SL; Tableau 1) par 454 Genome Sequencer FLX Titanium (appelé 454 dans la suite du document). Cette approche a permis de générer 369105 reads (69 Mb) pour l'isolat SC et 419725 reads (139,5 Mb) pour l'isolat SL. Ces données ont été assemblées et un transcriptome de référence comprenant 166156 clusters d'ADNc a pu être établi, contenant 87467 clusters de *P. viticola* et 78689 de *V. vinifera*. Dans un deuxième temps, le séquençage d'ADN génomique de zoospores de l'isolat Pv221 (Tableau 1) a été réalisé par Solexa Hiseq2000. L'assemblage de ces données de séquençage a permis d'établir une première ébauche de génome pour *P. viticola* (48820 *scaffolds*; taille du *scaffold* à 50% de la distribution = 5535 pb). L'ensemble de ces ressources est disponible sur un portail internet développé par l'équipe de Jérôme Gouzy au LIPM (INRA, Toulouse).

Tableau 1 : Caractéristiques des isolats utilisés pour obtenir les séquences d'ADNc et d'ADNg de *P. viticola*.

Isolate	Host of origin	P. viticola species	Year	Collecting site
SC	V. vinifera	В	2005	Colmar, France
SL	Bianca	В	2008	Lednice, Czech Republic
Pv221	V. vinifera	В	2009	Blanquefort, France

Table 1 : Caracteristics of isolates used to obtain cDNA and gDNA P. viticola sequences.]

## Recherche des gènes candidats dans la banque d'ADNc

L'ensemble de la démarche de recherche de gènes RxLR candidats dans le génome de *P*. *viticola* est résumé dans la figure 1 et la liste des gènes candidats identifiés au fur et à mesure de la démarche sont présentés dans le tableau S1.

Notre recherche a été ciblée sur les gènes candidats RxLR puisque, jusqu'à présent, la majorité des gènes d'avirulence qui ont été clonés chez les oomycètes correspondent à des gènes de type RxLR (Jiang et Tyler, 2012). Une première recherche a été effectuée sur les banques d'ADNc parmi les séquences présentant un peptide signal prédit par SignalP (http://

www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) (Emanuelsson et al. 2007), la banque génomique étant indisponible à cette époque. Le logiciel PatScan (Dsouza et al, 1997) permet d'effectuer des recherches automatisées de patrons en indiquant le motif nucléique ou protéique recherché (ici, RxLR).

Les critères de recherche étaient les suivants :

- présence d'une méthionine en début de séquence
- présence d'un motif RxLR entre 25 et 70 acides aminés après la méthionine.

Cette recherche a également été effectuée pour tous les RxLR-like constitués d'un ensemble de motifs prédits comme permettant la translocation des effecteurs dans les cellules de la plante (Kale et al. 2010, Tian et al. 2011): RxLG, RxLQ, RxFR, RxMR, RxYR, QxLR, HxLR. Un total de 1194 séquences correspondant aux critères de recherche a été trouvé. Une analyse de Blat nucléotidique contre la version 12X du génome de V. vinifera (http://www.genoscope.cns.fr/blat-server/cgi-bin/vitis/webBlat) (Jaillon et al. 2007) a permis d'identifier les séquences de vigne (n = 631) et de les retirer de notre ensemble de gènes candidats. Sur les 563 gènes candidats restants, la présence d'un peptide signal prédit sur le portail Plasmopara a été vérifiée via le programme SignalP v. 4.0 (Petersen et al. 2011). De même, l'absence d'hélices transmembranaires a également été vérifiée en ligne via le programme TMHMM v. 2.0 (Krogh et al. 2001). Les effecteurs décrits jusqu'à présent chez les oomycètes étant de petite taille, nous avons limité nos recherches à des séquences dont la taille de la protéine était comprise entre 80 et 400 acides aminés. Enfin, pour éviter de sélectionner des séquences avec d'éventuelles erreurs de lecture, seules les séquences présentent dans la banque d'ADNc avec au moins deux 'reads' ont été conservées. L'utilisation de ces critères a permis d'identifier 135 gènes candidats.

Une recherche de similarités entre les gènes candidats identifiés et les transcrits du génome de *P. infestans* a permis d'identifier 8 séquences correspondant à des effecteurs candidats de type RxLR chez *P. infestans*, et 5 séquences correspondant à des effecteurs candidats de la famille des Crinklers. Cette recherche a également permis d'écarter toutes les séquences candidates possédant un hit commun avec des protéines dont la fonction est déjà connue comme étant impliquée dans d'autres processus. Le but final étant d'effectuer l'expression transitoire de ces gènes candidats dans des feuilles de vigne, seules les séquences protéiques complètes ont été conservées, soit au total, 26 gènes candidats (Tableau 2).

## Validation des gènes candidats par amplification et séquençage

Des amorces, incluant les codons START et STOP, ont été dessinées (Tableau 2). Des tests d'amplification ont été effectués sur des isolats européens collectés sur *V. vinifera* cv Cabernet sauvignon (variété sensible), sur Regent (variété résistante), et sur des isolats américains prélevés sur différentes plantes-hôtes : *V. aestivalis, V. labrusca, V. vinifera, V. riparia* correspondant à différentes espèces crytpiques de *P. viticola* (Tableau S2). Les tests

ont également été effectués sur un témoin 'vigne' (V. vinifera) pour s'assurer de la spécificité

des amorces utilisées.

Tableau 2 : Liste des 26 gènes candidats avec une séquence protéique complète identifiés dans les séquences d'ADNc.

[Table 2 : List of the 26 candidate genes with complete protein sequence identified in cDNA sequences.]

aDNA nama	Size	Size	RxLR	RxLR
CDNA name	(nt)	(aa)	motif	posi
Plvit000132	281	94	RXLR	31
Plvit000312	707	236	RXLR	52
Plvit000819	446	149	RXLQ	52
Plvit001100	653	218	RXLR	52
Plvit006422	377	126	RXLQ	36
Plvit007625	482	161	RXLQ	52
Plvit007953	407	136	RXLR	50
Plvit011279	512	171	RXLG	69
Plvit014185	509	170	RXMR	66
Plvit014833	416	139	RXLR	50
Plvit016255	371	124	RXLG	43
Plvit017225	386	129	RXLQ	50
Plvit017489	260	87	RXLG	64
Plvit018218	629	210	QXLR	61
Plvit018752	440	147	QXLR	49
Plvit020343	464	155	RXFR	73
Plvit025723	287	96	RXLQ	70
Plvit027872	242	81	RXYR	75
Plvit028706	392	131	RXLR	38
Plvit033670	365	122	RXLG	46
Plvit033673	269	90	RXLR	52
Plvit034380	386	129	QXLR	41
Plvit043319	242	81	RXLQ	58
Plvit054642	362	121	RXLG	57
Plvit056744	260	87	HXLR	38
Plvit057216	242	81	HXLR	75

Les amplifications PCR ont été effectuées dans un volume final de 30 µl contenant 1 µl d'ADN génomique dilué au 1/3, 2 mM de MgCl2, 150 µM de chaque dNTP, 4 pmol de chaque amorce, 0.3 unités de Taq polymérase (Taq Silverstar DNA polymerase) et 1X de tampon de réaction. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : 4 min. à 95°C, puis 40 cycles de 40 sec. à 95°C, 45 sec. à 56°C, 90 sec. à 72°C, suivis de 10 min. à 72°C. Après vérification de chaque amplification sur gel d'agarose, les produits PCR ont été séquencés par séquençage direct selon la méthode de Sanger.

Pour les isolats européens, les 26 gènes ont pu être amplifiés et séquencés. Pour les isolats américains, 19 gènes ont pu être amplifiés correctement sur l'espèce B), et seulement 4 sur les

isolats des espèces A et C. Ces premiers tests ont mis en évidence des problèmes de séquençage liés à la technologie 454 induisant des erreurs dans les séquences et donc dans la prédiction des motifs RXLR et des codons STOP. En effet, des indels dans les séquences ont entrainé des décalages dans le cadre de lecture modifiant complètement la séquence attendue. En parallèle, une recherche par la méthode de PsiBlast (Position Specific-Iterated Blast) a été effectuée dans la base de données d'ADNc, et a permis d'identifier 19 gènes candidats. Ceci étant, nous avons décidé de vérifier l'exactitude des 154 séquences candidates identifiées (140 identifiées avec PatScan et 19 identifiés avec PsiBlast) en les confrontant, via une recherche tblastx (recherche sur une base nucléotidique traduite avec une séquence nucléotidique traduite), à la séquence génomique obtenue par la technologie Illumina HiSeq2000.

#### Confrontation des gènes candidats identifiés à la banque d'ADNg

En réalisant une recherche tblastx dans la banque d'ADN génomique, nous avons confirmé la séquence protéique de 51 gènes candidats (pas d'indel, présence d'un motif RxLR ou RxLRlike, présence éventuelle d'un motif EER-like en aval) sur les 154 gènes candidats précédemment identifiés. Ne pouvant pas confirmer la séquence des autres gènes candidats, seuls ces 51 gènes ont été conservés pour la suite de la recherche. De même, parmi les 26 gènes qui avaient été précédemment testés par PCR, la séquence de 18 d'entre eux a pu être confirmée dans la séquence génomique (Table S1).

Afin d'essayer d'identifier de nouveaux gènes candidats dans le génome, nous avons réalisé une recherche de similarité entre notre sélection de gènes candidats et la séquence génomique de *P. viticola*. Une analyse de tblastn (recherche de similarité sur une base nucléotidique traduite avec une séquence protéique) a donc été effectuée entre les 51 gènes candidats et la séquence génomique. Pour chaque gène candidat, les 10 premiers 'hits' ont été retenus conduisant à un total de 261 séquences. Parmi les 261 séquences identifiées, il existe des hits communs entre plusieurs des 51 candidats, constituant finalement un total de 188 séquences uniques. Au sein de ces 188 séquences uniques, 56 correspondaient à des séquences protéiques complètes. Parmi ces 56 gènes candidats, 21 s'organisent en 7 groupes formés de candidats qui ont la partie N-terminale semblable puis la partie C-terminale variable. Deux exemples de ces groupes sont présentés sur la Figure 2. Des amorces ont été dessinées uniquement pour les 56 séquences complètes et des tests d'amplification ont été effectués sur l'ADN génomique de l'isolat ayant servi à produire la banque d'ADNg (Pv221). Les mix PCR et les programmes d'amplification sont identiques à ceux expliqués précédemment.

A	RxLR	В	QxLR dEER
gPlvit007370_1 gPlvit013568_5 gPlvit000878_6 gPlvit007370_4		gPlvit034894_5 gPlvit038410_5_ gPlvit138196_2 gPlvit020334_3 gPlvit135818_6	MRRLFLFVLFLTTFLATGRCIVDAGQGSQHLRRGLQEEAGEDEERIKLPG 50 MRRLFLFVLITTFLATGRCIVDAGQGSQHLRRGLQEEAGEDEERIKLPG 50 MRRLYLFVLITTFLTTGRCIVDAGQGSQHLRRGLGEEAGEDEERIKLPG 50 MRRSGVFVLILATFLTTTHGTVDAGQGSQHLRSKLFEKAGHREGEASSLP- 49 MRRSGVFVLILATFLTTHGTVDAKQGSQHLRSKLFEKAGHREFSMGLPI 50
gPlvit007370_1 gPlvit013568_5 gPlvit000878_6 gPlvit007370_4 gPlvit007370_1	QETTYEKKPGVNDVÄAEERSSLYRKFLYRLFGDRHDVEVKVLARDSNWLINIFRRK 106 QETTYEKKLGVNDVÄAEERSLG	gPlvit034894_5 gPlvit038410_5_ gPlvit138196_2 gPlvit020334_3 gPlvit135818_6	-FKVPKGRSKLNLRAKTKALATRAALKMFRKKRLSRARQTPKKAAAT 96 -FKVPKGRSKLNLRAKTKALATRAALKMFRKKRLSRARQTPKKAAAT 96 -FKLPKSFGKRFKQKLSTKTKAFATRAASAMFQKKKGPLYGKYYKNGKP 99 NLFKGFRLTAPKIDAAAKAAKTETEAQASEEAAGGATTVYGT 92 VINELKSKPNTKIKTLPLGARARKFNALKVRGSNKVDANQRRKQHDFFSF 100
gPlvit013568 <sup>-</sup> 5 gPlvit000878 <sup>-</sup> 6 gPlvit007370 <sup>-</sup> 4	IIPRFGR3GH       112         LYNKVSRAEHRQVPATRH       134         FVWWAKNKPEFNKNADMHKEAMV       140	gPlvit034894_5 gPlvit038410_5_ gPlvit138196_2 gPlvit020334_3 gPlvit135818_6	PADPNAPKLGAPGPRTYKDPKMPTIYENAV 126 PADPNAPKLAAGPRNRKDPKMPTIYENAV 126 KRQTPQIAATGPAKPKG-QSP

Figure 2 : Alignement des groupes de protéines RxLR pour les gènes candidats RxLR 40 et 20. Les motifs canoniques (A) RxLR et (B) QxLR sont indiqués en rouge, ainsi que le motif dEER.

[Figure 2 : Alignment of the groups of protein sequences for RxLR 40 and 20 candidate genes. Canonical motifs (A) RxLR and (B) QxLR are indicated in red, as well as for the dEER motif.]

Sur les 56 couples d'amorces testés, 24 ont été écartés après les tests d'amplification sur l'isolat Pv221 pour trois raisons. Premièrement, dix couples d'amorces n'ont pas permis d'obtenir une amplification. Deuxièmement, dix couples d'amorces conduisaient à l'amplification de séquences identiques à d'autres couples d'amorces attendues pour amplifier des séquences proches. Enfin, quatre couples d'amorces conduisaient à un séquençage difficilement interprétable (électrophorégramme illisible probablement lié à l'amplification de plusieurs locus). Au final, nous avons donc identifié 32 gènes candidats dont la taille varie de de 62 à 430 acides aminés. Les caractéristiques de ces gènes candidats sont présentées dans le tableau 4. Parmi ces 32 gènes, 14 possèdent un motif RxLR (au sens strict), 13 possèdent un motif RxLR-like, 3 possèdent un motif RxLR dégénéré compilé au motif dEER, et enfin 2 n'ont pas de motif RxLR identifiable. Le motif dEER est présent dans 23 séquences sur 32.

Pour 16 gènes candidats, le serveur HHPred (Soding *et al*, 2005), qui détecte de l'homologie de séquences et prédit des homologies de structures entre protéines, indique de l'homologie avec des protéines impliquées dans les processus de l'interaction (dont 12 sont homologues de protéines RxLR). Les résultats des Blast avec les génomes d'autres oomycètes corroborent ces résultats puisque 13 de nos gènes candidats présentent des homologies de séquence avec des gènes RxLR (Tableau 3).

Il est important de noter que certains des gènes candidats possèdent plusieurs copies le long d'un même *scaffold* de la séquence génomique, c'est a dire, forment des répétitions en tandem sur le génome. Par exemple, deux copies du gène candidat RxLR 47 sont présentes sur le *scaffold* gPlvit080128 aux positions 7545 et 7847, et trois copies sur le *scaffold* gPlvit025824 aux positions 2227, 4700 et 7278.

e <u>3 : LISU OI C</u>	andidate genes cu	ntirm	ea by չ	genomic ser	quence.ar	nplified on	several isolates to test their poylmorphism.]	
<b>RxLR</b> gene								BlastNCBI
candidat		Size	size	RxLR	RxLR	dEER		positive to
Name	<b>Original name</b>	(nt)	(aa)	motif	position	position	HHPred RXLR	known RxLR
<b>RxLR 14</b>	gPlvit006487_3	825	275	RTLQ	47	63		
<b>RxLR 55</b>	Plvit119087	210	70	RSLR	31	58		X
<b>RxLR 52</b>	Plvit108233	186	62	RFLR	47			
<b>RxLR 01</b>	gPlvit086026_4	300	100	RTLR	21	33	N-acetylglucosamine deacetylase(78%)	
<b>RxLR 17</b>	Plvit004437	783	261	RTLQ	28	55	Zinc-finger (aas 49-95, 95%)	Х
<b>RxLR 50</b>	gPlvit000548_6	465	155	RFLR	48	64	Avr3a4(98%)	Х
<b>RxLR 45</b>	gPlvit115027_1	435	145	RHLR	30	48		
<b>RxLR 26</b>	Plvit007953	408	136	RLLR	46		Avr3a4/Avr3a11(both 99%)	Х
<b>RxLR 39</b>	gPlvit013568_5	345	115	RFLR	56	82		
<b>RxLR 46</b>	gPlvit001750_1	393	131	RQLR	34			
<b>RxLR 47</b>	gPlvit065801_1	804	268	RYLR	47	63		
RxLR 30	gPlvit003269 4	1293	431	TLHEER	31	58	Avr3a4(87%)/ATR1(80%)	Х
<b>RxLR 27</b>	gPlvit033181_4	999	222	RGLR	28		ABC trasnporter (45 to 72, 91%)	Х
<b>RxLR 06</b>	Plvit000810	585	195	/			2x ATR1 (50% each)	X
<b>RXLR 53</b>	gPlvit008528_4	828	276	RGSR	50	65		
<b>RxLR 28</b>	gPlvit012315_5	408	136	RSLR	41		Avr3a4(98%)/Pexrd2(97%)	Х
<b>RxLR 43</b>	Plvit020343	465	155	/				
<b>RxLR 40</b>	gPlvit000878_6	402	134	RRLR	56	79	hits transcriptional regulator (88%)	
<b>RxLR 42</b>	Plvit018752	441	147	QFLR	45		Avr3a4(94%)	Х
<b>RxLR 03</b>	gPlvit006548_5	1050	350	RSNLR	38	73	NADH pyrophosphatase, Nudix (99%)	Х
<b>RxLR 21</b>	gPlvit138196_2	357	119	RGLQ	32	45		Х
RxLR 51	gPlvit001520_3	378	126	RSLR	32			
<b>RxLR 23</b>	gPlvit003037_6	405	135	RPGTL	41	58	Avr3a4(94%)/ATR1(64%)	Х
<b>RxLR 35</b>	gPlvit001433_2	783	261	RKGR	33	62	Avr3a4(80%)/Avr3a11(69%)(+AcylCarrier, 78%)	(
RxLR 11	gPlvit007128_3	837	279	RTLQ	46	62		
<b>RxLR 49</b>	Plvit033670	366	122	RGLG	25	43		
<b>RxLR 20</b>	Plvit006422	387	129	RGLQ	32	45		Х
RxLR 31	gPlvit006949_1	1290	430	TSREEL	31	58	Avr3a4(87%)/ATR1(80%)	Х
<b>RxLR 36</b>	gPlvit014265_1	864	288	RKGR	33	62	Avr3a4(80%)/Avr3a11(69%)(+AcylCarrier, 78%)	
<b>RxLR 34</b>	gPlvit003812_6	816	272	QKGR	34	63	Avr3a4(80%)/Avr3a11(69%)(+AcylCarrier, 78%)	_
RXLR 33	Plvit011279	513	171	RTLG	65	LL		
<b>RxLR 29</b>	gPlvit044333_6	1284	428	TLREER	50	65	Avr3a4(87%)/ATR1(80%)	Х

Tableau 3 : Liste des gènes candidats confirmés par la séquence génomique amplifiés sur un ensemble d'isolats pour tester leur polymorphisme. [Table 3 : List of candidate genes confirmed by genomic sequence.amplified on several isolates to test their poylmorphism.]

# 3.3. Analyse du polymorphisme et de la sélection exercée sur les effecteurs candidats de *P. viticola*

Les 32 couples d'amorces amplifiant les 32 gènes candidats ont été sélectionnés pour tester le polymorphisme de séquences de l'ensemble des isolats de *P. viticola* indiqués dans le tableau 4.

Aux Etats-Unis, nous avons choisi plusieurs isolats pour chaque espèce cryptique de mildiou. Au moment de cette étude, nous n'avions pas encore identifié l'espèce E. De plus, les isolats de l'espèce D permettent difficilement d'obtenir des amplifications. Nous avons donc fait les tests de polymorphisme sur les espèce A, B et C. Afin d'identifier si la gamme d'effecteurs au sein de l'espèce B est différente en fonction de la plante-hôte, nous avons choisi des isolats collectés sur trois *Vitis* différents : *V. vinifera, V. labrusca, V. aestivalis*. En Europe, où seule l'espèce B a été introduite, nous avons montré l'existence d'isolats virulents et avirulents vis à vis du QTL *Rpv3*. Nous avons donc choisi des isolats collectés sur Regent (variété résistante) et des isolats collectés sur des cultivars de *V. vinifera* (sensibles). Pour tous ces isolats, le phénotype de virulence/avirulence sur Rpv3 avait été précédemment confirmé.

Tableau 4 : Caractéristiques des isolats de *P. viticola* utilisés pour l'étude de polymorphisme de 32 gènes candidats.

			Virulent/	
Isolate	Host of origin	P. viticola species	avirulent on Regent	Collecting site
Pv393	V. vinifera	В	Avirulent	Cugnasco, Switzerland
Pv340	V. vinifera	В	Avirulent	Tolcsva, Hongary
Pv257	V. vinifera	В	Avirulent	Listrac, France
Pv125	Regent	В	Virulent	Pècs, Hongary
Pv412	Regent	В	Virulent	Cugnasco, Switzerland
Pv13	Regent	В	Virulent	Latresne, France
MSU1106	V. vinifera	В	/	Clarksville, Michigan, USA
NY220	V. vinifera	В	/	Long Island, New York, USA
MSU1052	V. labrusca	В	/	Fenville, Michigan, USA
MSU319	V. labrusca	В	/	Stones, Ohio, USA
MSU330	V. aestivalis	В	/	Markko, Ohio, USA
WV16	V. aestivalis	В	/	Convington, West Viriginia, USA
MSU162	V. vinifera	С	/	Jackson, Michigan, USA
FLO23	hybrid (V. aestivalis)	С	/	Thallahassee, Floride, USA
NY328	V. riparia	А	/	Ithaca, New York, USA
MSU1172	V. riparia	А	/	Fennville, Michigan, USA

[Table 4 : Characteristics of *P. viticola* isolates used for polymorphism study of 32 candidate genes.]

Les gènes candidats ont tous été séquencés dans un seul sens, sauf ceux dont la taille était supérieure à 500 paires de bases, qui ont été séquencés dans les deux sens. Les séquences ont été analysées avec le logiciel CodonCode Aligner (v. 2.0.6, Codon Code Corporation). Tous les sites polymorphes ont été confirmés par un examen manuel des électrophorégrammes. Pour les sites hétérozygotes, nous avons gardé les deux allèles sans reconstruire la phase (le nombre limité d'isolats séquencés nous empêche de calculer la phase). L'étude du polymorphisme des séquences a été effectuée grâce au logiciel DnaSP v. 4.00.6 (Rozas *et al.* 2003) et les tests de sélection positive basés sur le  $d_N/d_S$  ont été effectués avec le logiciel MEGA v5 (Tamura *et al.* 2011).

Les 32 gènes candidats ont pu être amplifiés et séquencés sur les isolats européens, cependant certains n'ont pas pu être amplifiés sur les isolats américains. Même si les isolats de l'espèce B ont pu être amplifiés dans la majorité des cas, sept gènes candidats n'ont pas été amplifiés pour les isolats collectés sur *V. vinifera*, neuf pour les isolats collectés sur *V. aestivalis*, et douze pour les isolats collectés sur *V. labrusca*. Seulement neuf gènes candidats ont pu être amplifiés pour les isolats de l'espèce C et trois pour les isolats de l'espèce A (Tableau 5).

La présence d'un codon STOP au milieu de la séquence a été observée dans 6 gènes candidats. Pour trois d'entre eux, les mutations correspondent à des sites homozygotes (RxLR27, RxLR11, RxLR53). Dans les 3 autres cas, le codon STOP est lié à l'un des deux allèles au niveau de sites hétérozygotes. C'est le cas pour les gènes candidats RxLR43, RxLR33 et RxLR17 (Tableau 5).

		p value	1	1	-	-	1	-	1	-	-	/		-	-	1	-	-	0.46	1	/	0.44	0.47	-	-	-	-	0.16	0.15	/	<b>`</b>	0.01	-	1
Europe		dv/ds	0.214	0.472	0.195	0.214	0.080	0.000	0.076	0.662	0.683	/	0.277	0.533	0.433	0.427	0.543	0.427	1.061	0.657	/	1.150	1.074	0.414	0.212	0.162	0.504	/	/	/	<b>`</b>	/	0.331	0.909
es B in		%	2.04	2.40	2.37	4.17	1.54	0.25	1.40	2.33	0.82	0.00	3.83	1.72	2.03	6.47	2.05	1.74	2.12	2.31	0.00	0.61	0.78	1.62	0.95	3.23	1.81	0.25	0.13	0.00	0.00	0.39	0.46	0 93
Speci	uou	syn mut	ω	6	4	7	7	0	1	9	0	0	14	5	4	30	11	4	9	14	0	4	ς	12	4	7	5	1	1	0	0	5	-	σ
		syn mut	S	٢	٢	10	٢	1	4	ω	-	0	16	Э	ω	22	9	e	7	9	0	1	1	6	9	4	ŝ	0	0	0	0	0	1	4
		p value	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.26	0.29	1	1	1	1	1	1					
		dv/ds	0.237	0.356	0.474	0.329	0.416	0.452	0.633	1.086	1.535	0.224	0.301	0.320	0.371	0.397	0.444	0.480	0.575	1.024	0.708	1.150	2.148	0.404	0.508	0.162	0.504	0.625	0.639					
pecies B		%	3.31	4.20	11.83	6.62	6.32	3.19	9.52	5.94	3.01	2.33	8.68	2.58	4.35	9.20	5.43	3.73	5.56	6.25	5.50	4.90	1.36	3.56	3.71	3.23	1.81	0.74	2.55					
Ś	uou	syn mut	4	14	32	14	19	8	23	13	6	ω	42	9	8	38	27	6	13	40	32	32	9	26	24	6	S	7	14					
	[	syn mut	9	14	23	13	18	5	11	4	7	4	26	9	7	30	18	9	8	11	14	8	1	20	15	4	ę	1	9					
		) zalue			-		1	1	1	1	1																							
		H Av/ds v	0.383	0.414	0.465	0.355	0.416	0.452	0.525	0.803	0.768																							
Global		%	16.54	15.32	18.92	13.24	19.83	6.37	14.57	15.25	3.55																							
	uou	syn mut	29	44	49	29	64	16	26	34	6																							
		syn mut	27	39	36	25	43	10	15	14	4																							
		A <sup>a</sup>	Х	X*	X																													
		C ª	х	Х	X*	х	X	Х	Х	Х	Х																							
USA		B lap	Х	X	X*	x	Х	Х	×	×		×	x	×	X	X	X*	X	х	X				×	х									
		B	х	Х	X*	×	X	Х	Х	Х	Х	Х	х*	Х	Х	X	Х	Х	X	×	X*	x	x*					Х	X					
		B <sup>a</sup> vin	Х	X	*X	×	Х	Х	×	×	×	X	*x	×	×	X	Х*	X	×	X	*x	x	×	x	х	×	x							
Europe		$\mathbf{B}^{\mathrm{a}}$	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	X	X	Х	×	Х	X	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	X	Х	Х	Х	X	٨
1	RxLR	gene candidat	RxLR 46	<b>RxLR 27</b>	RxLR 43	<b>RxLR 26</b>	<b>RxLR 06</b>	<b>RxLR 28</b>	<b>RxLR 21</b>	<b>RxLR 20</b>	<b>RxLR 49</b>	<b>RxLR 01</b>	<b>RxLR 17</b>	<b>RxLR 50</b>	<b>RxLR 39</b>	<b>RxLR 47</b>	<b>RxLR 53</b>	RxLR 40	<b>RxLR 51</b>	<b>RxLR 36</b>	RxLR 11	<b>RxLR 34</b>	RxLR 33	RxLR 30	RXLR 03	<b>RxLR 52</b>	<b>RxLR 42</b>	<b>RxLR 23</b>	<b>RxLR 35</b>	RxLR 14	<b>RxLR 55</b>	<b>RxLR 29</b>	<b>RxLR 45</b>	DvI D 31

- Chapitre 3 : Identification et caractérisation d'effecteurs candidats de Plasmopara viticola impliqués dans la virulence -

122

Tableau 5 : Amplification, polymorphisme et test de sélection positive pour 32 gènes candidats de type RxLR sur des isolats de *P. viticola* collectés sur différentes plantes-hôtes en Europe et en Amérique du Nord. X : amplification positive ; x : amplification positive pour un isolat sur deux aux USA; \* : séquence plus courte (codon stop anticipé) ; <sup>a</sup> espèce crytpique de mildiou (A, B, C) et plante-hôte d'origine (vin : *V. vinifera*, aes : *V. aestivalis* ; lab : *V. labrusca*) ; (non) syn mut : nombre de mutations synonymes (et non synonymes) ; % : pourcentage de sites polymorphes ; p-value: valeur du test de sélection positive effectué sur le logiciel MEGA. Pour comparaison, ces mêmes données ont été calculées sur les séquences de la tubuline identifiées dans le chapitre 1 de la thèse (en utilisant uniquement les haplotypes les plus fréquents).

[Table 5 : Amplification, polymorphism and positive selection test for the 32 RxLR candidate genes on *P. viticola* isolates collected on several hosts plants in Europe and in North America. X : positive amplification ; x : positive amplification for one of the two isolates in USA ; \* : shorter sequence (presence of earlier stop); <sup>a</sup> downy mildew cryptic species (A, B and C) and host plant of origin (vin : *V. vinifera*, aes : *V. aestivalis*; lab : *V. labrusca*); (non) syn mut : number of synonymous and non synonymous mutations; % : percentage of polymorphic sites ; p-value : p-value of test of positive selection performed using the software MEGA. For comparison, data are also provided for tubuline sequences identified in the chapter 1 of the thesis (using only the most frequent haploypes).]

Pour les gènes qui ont pu être amplifiés sur plusieurs espèces cryptiques de mildiou, le taux de polymorphisme moyen (13,7%) est comparable au taux de polymorphisme observé pour la tubuline. Même si leur valeur de  $d_N/d_S$  est nettement plus élevée que celle de la tubuline, aucun de ces gènes ne semble être sous sélection positive. Parmi ces 9 gènes, deux présentent un taux de mutations plus faible que les autres gènes (6,3% pour RxLR28, et 3,5% pour RxLR49).

Pour tous les gènes qui ont pu être amplifiés à la fois pour des isolats de l'espèce B collectés aux Etats-Unis et ceux collectés en Europe, le taux de polymorphisme moyen (4,79%) est légèrement plus élevé que celui de la tubuline (3,44%). Comme précédemment, tous ces gènes ont une valeur de  $d_N/d_S$  plus élevée que celle de la tubuline, celle-ci ne présentant aucune mutation non synonyme. Parmi ces gènes, deux semblent être sous sélection positive : le gènes RxLR33 avec un  $d_N/d_S$  de 2,14 ; et le gène RxLR34 avec un  $d_N/d_S$  de 1,15. Ces gènes sont également sous sélection positive au sein des isolats européens mais de manière non significative.

Pour la population d'isolats européens, le taux moyen de mutations (1,59%) est plus élevé que le taux de mutation au niveau de la tubuline (0,95%). Quatorze gènes candidats présentent des séquences identiques pour les six isolats européens testés. Le gène RxLR29 est significativement sous sélection positive. Des séquences de ce gène n'ont pu être obtenues que pour les isolats européens au sein desquelles cinq mutations non synonymes ont été mises en évidence. Deux autres gènes candidats (RxLR23 et RxLR35) semblent être sous sélection positive. Cependant, ce résultat est à considérer avec précaution puisqu'il résulte, dans les deux cas, de la présence d'une seule mutation non synonyme dans la séquence.

## 3.4. Discussion

## Identification de gènes candidats de P. viticola impliqués dans la virulence

Nos données montrent que le génome de P. viticola possède des séquences de type RxLR et RxLR-like dont la séquence est prédite pour être sécrétée puisqu'elle possède un peptide signal. Ceci est en accord avec les observations issues du séquençage des génomes d'oomycètes qui a permis d'identifier un grand nombre de ces gènes (Kemen et al. 2011, Links et al. 2011, Baxter et al. 2010, Haas et al. 2009, Tyler et al. 2006, Tian et al. 2011, Lévesque et al. 2010). Notre recherche a également permis de mettre en évidence l'existence de protéines sécrétées avec un motif QxLR. Ce motif, jusqu'à maintenant décrit seulement chez Pseudoperononspora cubensis, semble donc être présent aussi dans le génome de P. viticola. Les génomes de P. infestans, P. ramorum et P. sojae contiennent approximativement entre 370 et 550 gènes codant pour des protéines sécrétées de type RxLR (Tyler et al. 2006, Jiang et al. 2008, Haas et al. 2009) alors que dans le cas de H. arabidopsidis, ce nombre chute à 134 (Baxter et al. 2010). L'approche utilisée nous a permis d'identifier 154 gènes effecteurs candidats dont la séquence complète a pu être confirmée pour 56 d'entre eux grâce au séquençage partiel du génome. Le nombre de gènes candidats potentiels est de l'ordre de celui trouvé dans le génome de H. arabidopsidis, le génome d'oomycète phylogénétiquement le plus proche de Plasmopara viticola : les deux espèces ont une taille de génome identique et partagent le fait d'être des biotrophes obligatoires. Cependant, il est important de noter que nous avons obtenu ces séquences grâce au séquençage du transcriptome et un génome fragmenté. Il est donc possible que le nombre de gènes candidats soit sous-estimé.

Les protéines codées par les gènes candidats RxLR06 et RxLR43 ne possèdent pas le motif canonique RxLR mais possèdent une homologie de structure avec ATR1, une protéine RxLR de *H. arabidopsidis* qui est le gène d'avirulence correspondant au gène de résistance *RPP1 d'Arabidopsis thaliana* (Rehmany, 2005). Cependant, il a déjà été montré que le motif RxLR n'est pas présent dans tous les gènes d'avirulence fonctionnels. En effet, le gène ATR5 de *H. arabidopsidis* qui interagit avec le gène de résistance RPP5 d'*A. thaliana* présente un motif GDR au lieu du motif RxLR (Bailey *et al.* 2011). Outre la présence de ce motif, il a été montré la présence d'un fold commun dans ces protéines (Boutemy *et al.* 2011, Win *et al.* 2012). Parmi les gènes candidats identifiés, certains possèdent des homologies de séquence et de structure avec des gènes de type RxLR ou Crinkler d'autres oomycètes. D'après les observations faites sur les autres génomes, il était attendu que seul un petit nombre de gènes

candidats soient conservés avec les génomes d'autres oomycètes (Baxter *et al.* 2010). Par exemple, seulement 30% des effecteurs de *H. arabidopsidis* possèdent plus de 20% d'identité avec des effecteurs de *Phytophthora* (Baxter *et al.* 2010).

Ces gènes semblent avoir des parties N-terminale conservées entre les différents locus. Win *et al.* (2007) ont décrit le fait que la partie N-terminale (servant à la sécrétion de la protéine dans les cellules de l'hôte) est plus conservée que la partie C-terminale (partie fonctionnelle de la protéine). Cette dernière semble, en effet, être la cible privilégiée de l'évolution adaptative imposée à ces séquences. Nous avons également observé que certains gènes candidats sont présents en plusieurs copies le long d'un même *scaffold*. Ceci a déjà été observé dans d'autres génomes, comme par exemple chez *H. arabidopsidis*, où des gènes ATR5-like présents sur le même cluster que le gène ATR5 semblent être apparus par duplication (Bailey *et al.* 2011).

Pour une grande partie des gènes candidats, la séquence protéique complète n'a pas pu être obtenue. Dans une majorité de cas, cela résulte du fait qu'elles se trouvaient aux extrémités des *scaffolds*. Cependant, pour les séquences présentes au milieu des *scaffolds*, il pourrait s'agir de pseudogènes. En effet, il existe un grand nombre de pseudogènes à motif RxLR dans les génomes des oomycètes (Win *et al.* 2007).

#### Caractérisation des gènes candidats

L'analyse de la présence et du polymorphisme des gènes candidats dans les populations reste préliminaire à cause du faible nombre d'isolats séquencés. Néanmoins, il est possible de commenter un certain nombre de nos résultats.

Une partie non négligeable des gènes candidats n'a pas pu être amplifiée pour l'ensemble des isolats testés, notamment pour les isolats collectés aux Etats-Unis. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la recherche des gènes candidats a été réalisée sur le génome d'isolats européens de l'agent pathogène (espèce B). Nous observons ainsi que la présence ou l'absence des gènes candidats, ainsi que l'existence de séquences tronquées, reflètent en partie les distances phylogénétiques entre l'espèce focale (espèce B) et les autres espèces cryptiques de mildiou analysées. Par exemple, pour l'espèce A, phylogénétiquement plus éloignée de l'espèce focale (B), peu de gènes candidats ont pu être amplifiés ; alors que pour l'espèce C, phylogénétiquement plus proche de l'espèce focale, un nombre plus important de gènes candidats a pu être amplifié.

Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que ces gènes ne sont pas présents dans ces isolats. En effet, la perte totale ou partielle de locus Avr pour acquérir de nouvelle virulence a déjà été mise en évidence chez *M. oryzae* (Yoshida *et al.* 2009), *Leptosphaeria maculans* (Gout *et al.*  2007), *P. infestans* (Gilroy *et al.* 2011), *H. arabidopsidis* (Cabral *et al.* 2011) et *P. sojae* (Cui *et al.* 2012). La présence d'effecteurs pour seulement une partie des isolats suggère que le gène a été perdu au cours de la co-évolution entre l'hôte et l'agent pathogène pour empêcher le déclenchement de l'immunité de l'hôte (Cabral *et al.* 2011). Par exemple, des formes tronquées du gène *Avr4* chez *P. infestans* sont présentes chez certains isolats et ne sont pas reconnues par les gènes de résistance de l'hôte (Van Poppel *et al.* 2008) ; de même pour le gène *Avr1b*-1 chez *P. sojae* (Cui *et al.* 2012). Dans notre cas, en fonction de l'espèce cryptique de mildiou et de la plante-hôte d'origine, des séquences tronquées ont aussi pu être mises en évidence. Ces séquences tronquées partetent non seulement d'éviter le déclenchement du système immunitaire des plantes mais permettent également un retour en arrière vers une protéine fonctionnelle. Ces allèles dégénérés, comme les pseudogènes, constituent des réservoirs génétiques (Ma et Guttman 2008).

On peut également noter que au sein de l'espèce cryptique B, le répertoire d'effecteurs semble être différent en fonction de la plante-hôte, même s'il existe une variabilité au sein des populations pour certains effecteurs (Tableau 5). Il est alors possible qu'un processus d'adaptation à la plante-hôte soit en cours au sein de l'espèce B. En effet, quelques modifications dans le répertoire d'effecteurs de l'agent pathogène pourraient suffire à s'adapter à une espèce végétale et conduire à un isolement reproductif et la spéciation ultérieure de l'agent pathogène (Schulze-Lefert et Panstruga 2011).

Peu de gènes candidats semblent être conservés entre les différentes espèces cryptiques de mildiou de la vigne. On peut supposer que les gènes qui sont conservés entre les espèces doivent être indispensables à l'agent pathogène soit pour l'interaction avec la plante-hôte, soit pour son développement. Si ces gènes sont impliqués dans la virulence, ils pourraient constituer d'excellentes cibles pour l'amélioration variétale. En effet, dans le but d'augmenter la durabilité de la résistance, il pourrait être intéressant de cibler les effecteurs très conservés pour lesquels la perte ou la mutation s'avérerait couteuse pour le pathogène (Bart *et al.* 2012). De même, le faible nombre d'effecteurs conservés entre les différents oomycètes est particulièrement intéressant car il peut contenir des gènes de pathogénicité ciblant des processus cellulaires conservés entre les différentes espèces végétales (Anderson *et al.* 2012).

Nous n'avons trouvé aucune mutation en lien avec la virulence des isolats européens sur la variété de vigne résistante Regent. Il est donc probable qu'aucun des 32 gènes candidats analysés ne soit impliqué dans le contournement de la résistance du QTL *Rpv3*. Ce résultat

n'est pas surprenant si l'on tient compte du faible nombre de gènes étudiés. Il est néanmoins possible que la virulence ne soit pas liée à la séquence primaire d'un effecteur mais à la régulation de son expression. En effet, l'expression différentielle des gènes, parfois associée à une délétion du gène ou une variation du nombre de copies du gène, a déjà été observée chez d'autres oomycètes, comme par exemple dans le cas des gènes d'avirulence *Avr1b, Avr1a* et *Avr3a* chez *P. sojae* (Shan *et al.* 2004, Qutob *et al.* 2009) ou *PiAVR2* chez *P. infestans* (Gilroy *et al.* 2011).

Un certain nombre de gènes ne présentent pas ou peu de polymorphisme de séquences. Il s'agit pour la plupart de gènes pour lesquels nous n'avons obtenu de séquences que sur les isolats européens. Dans ce cas, en effet, le polymorphisme est nécessairement limité en lien avec la réduction de la variabilité des populations de l'agent pathogène liée à son introduction en Europe (Chen *et al.* 2007; Rouxel *et al.* 2012a). Ainsi, logiquement, les taux de polymorphisme les plus élevés sont obtenus pour les gènes qui ont été amplifiés dans les différentes espèces cryptiques (A, B, C).

Trois gènes ont été identifiés comme étant sous sélection positive (RxLR29, RxLR33, RxLR34). Ces trois gènes présentent des taux de polymorphisme faibles et n'amplifient que les isolats appartenant à l'espèce B. L'un d'entre eux, RxLR29, n'amplifie même que les isolats européens dans lequel seules des mutations non synonymes ont été identifiées. Il semble donc que ces gènes soient soumis à une évolution rapide en lien avec la virulence de l'agent pathogène. Afin de valider cette hypothèse, il faudrait dans un premier temps augmenter le nombre d'isolats afin de pouvoir effectuer des analyses statistiques plus fines, basées sur d'autres tests : le test de McDonald et Kreitman (1991) qui est un rapport basé sur les taux de mutations entre espèces et nécessitant l'utilisation d'un outgroup ou le D de Tajima basé sur les fréquences alléliques. En incluant des populations différentes dans l'analyse, nous pourrions également tester les changements de régime de sélection entre groupes et/ou étudier le polymorphisme entre sites polymorphes au sein d'un même gène, afin de tester l'hypothèse de patrons d'évolution et d'adaptation différents entre les hôtes sauvages et cultivés (Stukenbrock *et al.* 2012).

Finalement, outre l'approche gène candidat effectuée ici, des études de génomique des populations permettraient la recherche de signatures adaptatives à l'échelle du génome entier entre espèces et/ou populations adaptées à des hôtes différents. L'approche d'écologie 'reverse' utilisée en génomique des populations permet en effet de détecter sans *a priori* les

régions du génome soumises à la sélection positive et d'analyser leur dynamique évolutive dans les populations (Aguileta *et al.* 2010, Chen *et al.* 2006, Anisimova *et al.* 2007, Prugnolle *et al.* 2008). Cette méthode peut conduire à identifier de nouvelles modifications génomiques impliquées dans l'interaction avec l'hôte, comme par exemple des mutations nucléotidiques, des réarrangements chromosomiques, de la perte ou du gain de gènes ou de catégories fonctionnelles, et même des évènements de transferts horizontaux. La démocratisation des méthodes de séquençage à haut-débit et la disponibilité prochaine d'un génome de référence de qualité pour *P. viticola* devrait permettre à court terme d'envisager d'utiliser cette approche pour identifier les déterminants génomiques responsables de l'adaptation du mildiou à la vigne.

# Tableaux supplémentaires

Tableau S1 : Liste des séquences sélectionnées au cours du processus d'identification des gènes candidats.

# [Table S1 : List of the sequences selected during the processus of candidate genes identification.]

			Detection	Set		Sequence	cDNA which shared same	complete sequences	Name of DyLD gaps candidate
Accession	<b>Motif</b> <sup>b</sup>	Size (aa) o	Method d	01 26 °	gDNA Blast f	decision s	after tblastn h	tblastn <sup>i</sup>	j
Plvit000132	RXLR	94	PatScan	yes	gPlvit086026	Кеер		1	RxLR 01
Plvit000250	/	240	PSIBlast		gPlvit006548	Keep		2	RxLR 02-03
Plvit000312	RXLR	236	PatScan	yes	gPlvit126769	Кеер		1	RxLR 04
Plvit001100	RXLR	218	PatScan	yes	gPlvit126769	Кеер	Plvit000312	/	
Plvit000810	/	480	PSIBlast		gPlvit038360	Кеер	DI 11000010	5	RxLR 05-06-07-08-09
Plvit001058	/	469	PSIBlast		gPlvit0/9411	Keep	Plvit000810	/	
Plvit001742 Plvit002428	/	455	PSIBlast		gPlvit055147	Keep	Plvit000810 Plvit000810		
Plvit002738	1	468	PSIBlast		gPlvit082354	Keen	Plvit000810	1	
Plvit000819	, RXLQ	149	PatScan PatScan-	yes	gPlvit032579	Кеер	1111000010	6	RxLR 10-11-12-13-14-15
Plvit007625	RXLQ	161	PSIBlast	yes	gPlvit014124	Keep	Plvit000819	/	
Plvit017225	RXLQ	129	PatScan	yes	gPlvit007128	Keep	Plvit000819	/	
Plvit004437	RXLQ	261	PatScan		gPlvit004319	Кеер		1	RxLR 17
Plvit006422	RXLQ	126	PatScan	yes	gPlvit038410	Кеер		4	RxLR 18-19-20-21
Plvit007530	DVID	297	PSIBlast		gPlvit122829	Кеер		4	RxLR 22-23-24-25
PIVIT00/953	RALK	136	PatScan	yes	gPIVIT113146	Кеер		1	RXLR 20
PIVIL006214	KALK	230	PatScan		gPIVIL055161	кеер		1	KXLK 27
Plyit008290	RYIR	139	PSIRlast		aPlvit012215	Keen		1	RvI R 28
Plvit008871	/	384	PSIBlast		gPlvit044333	Keen		4	RxLR 29-30-31-32
Plvit011279	/ RXLG	171	PatScan	ves	gPlvit033342	Кеер		1	RxLR 33
Plvit014185	RXMR	170	PatScan	ves	gPlvit003812	Кеер		4	RxLR 34-35-36-37
Plvit014833	RXLR	139	PatScan	yes	gPlvit007370	Keep		3	RxLR 38-39-40
			PatScan-		, in the second s	· ·			
Plvit016255	RXLG	124	PSIBlast PatScan-	yes	gPlvit147463	Кеер		1	RxLR 41
Plvit018752	QXLR	147	PSIBlast	yes	gPlvit059801	Кеер		1	RxLR 42
Plvit020343	RXFR	155	PatScan	yes	gPlvit109384	Кеер		1	RxLR 43
Plvit020632	RXLR	180	PatScan		gPlvit115027	Кеер		2	RxLR 44-45
Plvit028706	RXLR	131	PatScan	yes	gPlvit001750	Кеер		1	RxLR 46
Plvit028796	RXLR	164	PatScan		gPlvit080128	Кеер	DI-:+02070/	2	RxLR 47-48
PIVIT101555	RALK	140	PatScan		gPlvit010009	Кеер	PIVIt028796	/	
Plvit033670	DYLC	122	PatScan	VOC	gPlvit104002	Keep	F1V1L020790	/	DvI D 40
1111055070	IALG	122	PatScan-	yes	gr 10104902	Keep		1	KALK 49
Plvit033673	RXLR	90	PSIBlast	ves	gPlvit000548	Кеер		1	RxLR 50
Plvit098118	RXLR	129	PatScan		gPlvit001520	Кеер		1	RxLR 51
Plvit061658	RXLR	91	PatScan		gPlvit109384	Keep		3	RxLR 52-53-54
Plvit108233	RXLR	62	PatScan		gPlvit110414	Keep	Plvit061658	/	
Plvit119087	RXLR	70	PatScan		gPlvit068602	Кеер		2	RxLR 55-56
Plvit000373	RXFR	348	PatScan		gPlvit087571	keep		0	
Plvit000437	/	216	PSIBlast		gPlvit002962	keep		0	
Plvit004359	/ DVI D	374	PSIBlast		gPlvit064351	keep		0	
PIVI1009576	KXLK	325	PatScan		gPIVIT110936	кеер		0	
Plvit010786	RYIR	92	PSIRlast		aPlvit043018	keen		0	
Plvit017489	RXLG	87	PatScan	ves	gPlvit028180	keen		0	
Plvit020807	RXFR	90	PatScan	yes	gPlvit108828	keep		0	
Plvit022557	QXLR	177	PatScan		gPlvit068176	keep		0	
Plvit022980	RXLG	130	PatScan		gPlvit017725	keep		0	
Plvit034585	RXLG	84	PatScan		gPlvit015092	keep		0	
Plvit035113	RXLR	91	PatScan		gPlvit081350	keep		0	
Plvit035503	RXLR	57	PatScan		gPlvit043018	keep		0	
Plvit052742	RXLQ	147	PatScan		gPlvit074076	keep		0	
Plvit054503	RXLQ	149	PatScan		gPlvit106407	keep		0	
PIVIT104/95	RALK	99	PatScan		gPlvit032577	Reep		0	
Plvit005015	RAFR	265	PatScan		gPlvit011654	Discard			
Plvit008244	RXLG	185	PatScan		gPlvit090298	Discard			
Plvit008264	RXLO	236	PatScan		gPlvit094773	Discard			
Plvit008935	RXLQ	294	PatScan		gPlvit061370	Discard			
Plvit010267	QXLR	191	PatScan		gPlvit002791	Discard			
Plvit010268	RXLQ	170	PatScan		gPlvit002452	Discard			
Plvit011079	RXLR	425	PatScan		gPlvit065997	Discard			
Plvit011367	RXLQ	158	PatScan		gPlvit002432	Discard			
Plvit012704	RXLR	62	PatScan		gPlvit138669	Discard			
Plvit015007	QXLR	184	PatScan		gPIvit143702	Discard			
Plvit010355	HYID	205	PatScan		gPlvit03404	Discard			
Plvit017101	RXLO	252	PatScan		gPlvit072335	Discard			
Plvit018218	OXLR	210	PatScan	ves	gPlvit132970	Discard			
Plvit018884	QXLR	178	PatScan	, 00	gPlvit100260	Discard			
Plvit018898	RXLG	130	PatScan		gPlvit013466	Discard			
Plvit019080	RXLQ	149	PatScan		gPlvit065980	Discard			
Plvit020078	HXLR	118	PatScan		gPlvit014486	Discard			
Plvit020178	RXLR	227	PatScan		gPlvit146915	Discard			

	RXLQ	188	PatScan		gPlvit029202	Discard	
Plvit021794	RXLR	176	PatScan		Negative	Discard	
Plvit021859	RXFR	223	PatScan		gPlvit000455	Discard	
Phyi+021037		144	PatScan		gPlwit074482	Discard	
Divit021920	DVVD	199	DatScan		gDlwit042266	Discard	
PIVIL022198	RAIR	137	Patscan		gP1V1t042266	Discard	
Plvit022653	RXFR	166	PatScan		gPlvit131975	Discard	
Plvit022736	QXLR	130	PatScan		gPlvit000146	Discard	
Plvit022977	RXLR	47	PatScan		gPlvit018082	Discard	
Plvit023048	RXLQ	96	PatScan		gPlvit149810	Discard	
Plvit024339	QXLR	122	PatScan		gPlvit008557	Discard	
Plvit025275	RXLR	155	PatScan		gPlvit115213	Discard	
Plvit025340	RXLR	89	PatScan		gPlvit027995	Discard	
Plvit025560	RYMR	83	PatScan		gPlvit166188	Discard	
Dlwi+025700	DVLO	06	DatScan		gDlvi+112E96	Discard	
FIVIL025725	RALQ	90	FatStall	yes	grivit15500	Discalu	
Plvit025849	RXLQ	101	PatScan		gPlvit010299	Discard	
Plvit025894	RXLG	102	PatScan		gPlvit008783	Discard	
Plvit027872	RXYR	81	PatScan	yes	gPlvit010106	Discard	
Plvit028798	/	160	PSIBlast		gPlvit010428	Discard	
Plvit029079	RXLR	48	PatScan		gPlvit084947	Discard	
Plvit029456	HXLR	96	PatScan		gPlvit003836	Discard	
Plvit029697	RXLR	56	PatScan		gPlvit058754	Discard	
Plvit031992	RXLG	118	PatScan		gPlvit135513	Discard	
Plvit032326	RXLO	115	PatScan		gPlvit008756	Discard	
Dlwi+022920	/	160	DCIPlact		gDlvi+12E612	Discard	
Divit032070		100	DatCaan		gr1vit123013	Discard	
PIVIL033010	QALR	103	PatScan		gP1v1t032647	Discard	
PIVILU33539	QXLR	134	Patscan		gPIVITU04804	Discard	
Plvit033980	/	124	PSIBlast		gPlvit012273	Discard	
Plvit034380	QXLR	129	PatScan	yes	gPlvit074693	Discard	
Plvit034522	RXLG	98	PatScan		No hit	Discard	
Plvit035040	RXLR	102	PatScan		gPlvit011153	Discard	
Plvit039270	RXLR	139	PatScan		gPlvit007639	Discard	
Plvit040120	RXFR	97	PatScan		gPlvit065844	Discard	
Plvit040984	RXYR	84	PatScan		gPlvit021387	Discard	
Dlwi+041126	OVID	01	DatScan		gDlwi+012120	Discard	
Plvit041150	QALK	02	PatStall		gF1v1t015120	Discard	
PIVIT042957	RAMR	104	PatScan		gPIVIt085919	Discard	
Plvit043319	RXLQ	81	PatScan	yes	gPlvit141392	Discard	
Plvit043938	RXLG	90	PatScan		gPlvit064614	Discard	
Plvit052695	RXMR	131	PatScan		gPlvit015974	Discard	
Plvit053579	QXLR	155	PatScan		gPlvit108321	Discard	
Plvit054252	RXLR	163	PatScan		gPlvit046528	Discard	
Plvit054642	RXLG	121	PatScan	ves	gPlvit038762	Discard	
Plvit054982	RXLR	75	PatScan		gPlvit041450	Discard	
Plvit055321	RXLR	60	PatScan		gPlvit115990	Discard	
Plvit055384	RYLC	121	PatScan		No hit	Discard	
Divit055300	DVID	60	PatScan		aDivit006815	Discard	
PIVIL0555590	DVLD	107	PatStall		gF1v1t000015	Discalu	
Plvit055570	RXLR	107	PatScan		gPlvit12/314	Discard	
Plvit056018	RXLG	125	PatScan		gPlvit016618	Discard	
Plvit056478	RXFR	148	PatScan		gPlvit014333	Discard	
					0		
Plvit056744	HXLR	87	PatScan	yes	gPlvit047707	Discard	
Plvit056744 Plvit056756	HXLR RXLR	87 99	PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994	Discard Discard	
Plvit056744 Plvit056756 Plvit057048	HXLR RXLR RXYR	87 99 124	PatScan PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817	Discard Discard Discard	
Plvit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057216	HXLR RXLR RXYR HXLR	87 99 124 81	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes ves	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit002917	Discard Discard Discard Discard	
Plvit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057216 Plvit059657	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR	87 99 124 81 86	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit002917 gPlvit056604	Discard Discard Discard Discard Discard	
Plvit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057216 Plvit059657 Plvit060293	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXL0	87 99 124 81 86 82	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810	Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Plvit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057216 Plvit059657 Plvit060293 Plvit060616	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXLQ RXLP	87 99 124 81 86 82 77	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit002917 gPlvit055604 gPlvit055810	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Plvit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057216 Plvit059657 Plvit060293 Plvit060616 Dlvit061622	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXLQ RXLR	87 99 124 81 86 82 77 82	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit002917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit108483 cPlvit007290	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Plvit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057216 Plvit059657 Plvit060293 Plvit060616 Plvit061638	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXLQ RXLR RXFR RXFR	87 99 124 81 86 82 77 82	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit058483 gPlvit07288	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057216 Plvit059657 Plvit060293 Plvit06016 Plvit061638 Plvit062359	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXLQ RXLR RXFR RXFR RXLR	87 99 124 81 86 82 77 82 52	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit055810 gPlvit055810 gPlvit055810 gPlvit06818 gPlvit007288	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057048 Plvit059657 Plvit060293 Plvit060616 Plvit061638 Plvit061638 Plvit063126	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXLQ RXLR RXFR RXLR RXLR RXLR	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit058810 gPlvit060818 gPlvit060818 gPlvit128192	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057216 Pivit059657 Pivit060293 Pivit060293 Pivit061638 Pivit061326 Pivit063126 Pivit064197	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXLQ RXLR RXFR RXLR RXLR RXLR	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit108483 gPlvit07288 gPlvit060818 gPlvit060818 gPlvit060818	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057016 Plvit059657 Plvit060293 Plvit060616 Plvit061638 Plvit063126 Plvit064197 Plvit065039	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXLQ RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit08483 gPlvit007288 gPlvit06818 gPlvit06818 gPlvit128192 gPlvit06356 gPlvit142412	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057048 Plvit059657 Plvit060293 Plvit06016 Plvit061638 Plvit061638 Plvit063126 Plvit063126 Plvit065039 Plvit096745	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXLQ RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit128192 gPlvit128192 gPlvit142412 Bad hit	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057216 Pivit060293 Pivit060293 Pivit06016 Pivit06128 Pivit063126 Pivit063126 Pivit065039 Pivit065039 Pivit096745 Pivit102906	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXLQ RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59 112	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit055810 gPlvit05810 gPlvit060818 gPlvit060818 gPlvit060818 gPlvit128192 gPlvit06356 gPlvit12412 gPlvit104229	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057048 Plvit057216 Plvit060293 Plvit060235 Plvit063126 Plvit063126 Plvit064197 Plvit065039 Plvit096745 Plvit102906 Plvit104449	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXLQ RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59 112 80	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit058810 gPlvit06818 gPlvit06818 gPlvit06818 gPlvit128192 gPlvit06356 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit007639	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057048 Plvit059657 Plvit060293 Plvit0601638 Plvit061638 Plvit061638 Plvit063126 Plvit063126 Plvit065039 Plvit065039 Plvit096745 Plvit102906 Plvit104449 Plvit107403	HXLR RXLR RXYR HXLR RXFR RXLQ RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59 112 80 58	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit055810 gPlvit108483 gPlvit007288 gPlvit128192 gPlvit128192 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit007639 gPlvit003676	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057216 Pivit060293 Pivit060293 Pivit060126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit065039 Pivit065039 Pivit06745 Pivit102906 Pivit102409 Pivit10740	HXLR RXLR RXYR RXFR RXLQ RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59 112 80 58 47	PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit019847 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit058810 gPlvit060818 gPlvit060818 gPlvit060818 gPlvit060818 gPlvit128192 gPlvit060818 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit007639 gPlvit003676 gPlvit142932	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057048 Plvit057216 Plvit060293 Plvit060293 Plvit060616 Plvit06138 Plvit063126 Plvit064197 Plvit064197 Plvit065039 Plvit096745 Plvit102906 Plvit102906 Plvit107403 Plvit107740 Plvit107740	HXLR RXLR RXYR RXFR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 86 82 52 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115	PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit058810 gPlvit06818 gPlvit06818 gPlvit06818 gPlvit06356 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit007639 gPlvit007639 gPlvit007619	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057048 Plvit057216 Plvit060293 Plvit060293 Plvit0601638 Plvit061638 Plvit06138 Plvit061326 Plvit064197 Plvit065039 Plvit096745 Plvit102906 Plvit10449 Plvit107403 Plvit107403 Plvit107409 Plvit107498 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598	HXLR RXLR RXYR RXYR RXFR RXLQ RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82	PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit012817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit128192 gPlvit128192 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit003676 gPlvit149232 gPlvit03676	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit059657 Pivit060293 Pivit060293 Pivit06128 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit064197 Pivit065039 Pivit065039 Pivit065039 Pivit096745 Pivit102906 Pivit107403 Pivit108598 Pivit108699	HXLR RXLR RXYR RXFR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82	PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit019847 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit058810 gPlvit060818 gPlvit060818 gPlvit060818 gPlvit060818 gPlvit0888 gPlvit060818 gPlvit04289 gPlvit07639 gPlvit07639 gPlvit07639 gPlvit07639 gPlvit097639 gPlvit097639 gPlvit097639 gPlvit097649 gPlvit090576	Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057047 Pivit060293 Pivit060293 Pivit0602359 Pivit063126 Pivit064197 Pivit064197 Pivit065039 Pivit064197 Pivit096745 Pivit09745 Pivit107403 Pivit107403 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108689 Pivit108205	HXLR RXLR RXYR RXYR RXLR RXLR RXLR RXLR R	87 99 124 81 86 82 52 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 22	PatScan PatSca	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit08483 gPlvit007288 gPlvit06818 gPlvit06818 gPlvit128192 gPlvit006356 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit007639 gPlvit007639 gPlvit007639 gPlvit047261 gPlvit047261 gPlvit09005 gPlvit02475	Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057048 Plvit057216 Plvit059657 Plvit060293 Plvit0602359 Plvit063126 Plvit064197 Plvit064197 Plvit064197 Plvit096745 Plvit102906 Plvit104449 Plvit107403 Plvit107403 Plvit107403 Plvit108598 Plvit108689 Plvit108820 Plvit10251	HXLR RXLR RXYR RXYR RXLR RXLR RXLR RXLR R	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 47 115 82 112 82	PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit012817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit007288 gPlvit060818 gPlvit128192 gPlvit06356 gPlvit142412 Bad hit gPlvit003676 gPlvit14229 gPlvit003676 gPlvit149232 gPlvit07639 gPlvit03676 gPlvit149232 gPlvit07639 gPlvit0376	Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit059657 Pivit060293 Pivit060293 Pivit06128 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit06745 Pivit102906 Pivit102906 Pivit107740 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108251 Pivit10251 Pivit10251 Pivit11238	HXLR RXLR RXYR RXYR RXLR RXLR RXLR RXLR R	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 118	PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit01994 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit128192 gPlvit04229 gPlvit04229 gPlvit03676 gPlvit149232 gPlvit03676 gPlvit149232 gPlvit07261 gPlvit097261 gPlvit006815 gPlvit167846	Discard Discard	
Pivit056764 Pivit057676 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit059657 Pivit060293 Pivit060616 Pivit06138 Pivit063126 Pivit064197 Pivit065039 Pivit065039 Pivit096745 Pivit09745 Pivit102906 Pivit104449 Pivit107403 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108251 Pivit11238 Pivit11238	HXLR RXLR RXYR RXYR RXLR RXLR RXLR RXLR R	87 99 124 81 86 82 52 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 112 82 118 92	PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit05810 gPlvit0843 gPlvit008483 gPlvit00848 gPlvit00848 gPlvit008356 gPlvit128192 gPlvit006356 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit007639 gPlvit007639 gPlvit007639 gPlvit07261 gPlvit047261 gPlvit09005 gPlvit02475 gPlvit067845 gPlvit067846 gPlvit09909	Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057048 Plvit057216 Plvit060293 Plvit060293 Plvit060616 Plvit06138 Plvit063126 Plvit064197 Plvit064197 Plvit064197 Plvit064197 Plvit064197 Plvit064197 Plvit064197 Plvit102906 Plvit104449 Plvit107403 Plvit107403 Plvit108598 Plvit108689 Plvit108820 Plvit10251 Plvit112829 Plvit112829	HXLR RXLR RXYR RXYR RXLR RXLR RXLR RXLR R	87 99 124 81 86 82 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 58 47 115 82 112 82 112 82 73	PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit01994 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit003636 gPlvit142412 Bad hit gPlvit003676 gPlvit1424322 gPlvit003676 gPlvit142432 gPlvit003675 gPlvit012475 gPlvit091909 gPlvit091909 gPlvit091909 gPlvit097505	Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057216 Pivit060293 Pivit060293 Pivit060126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063127 Pivit065039 Pivit065039 Pivit065039 Pivit0096745 Pivit02906 Pivit102906 Pivit102906 Pivit107740 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108251 Pivit10251 Pivit11238 Pivit11229 Pivit114529 Pivit14529 Pivit14529	HXLR RXLR RXYR RXYR RXFR RXLQ RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 112 82 118 92 73 67	PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit01994 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit128192 gPlvit128192 gPlvit04242 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit03676 gPlvit149232 gPlvit03676 gPlvit149232 gPlvit047261 gPlvit04245 gPlvit068815 gPlvit068815 gPlvit068815 gPlvit07505 gPlvit087505 gPlvit087505	Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit059657 Pivit060293 Pivit060293 Pivit06128 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit064197 Pivit065039 Pivit096745 Pivit109740 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108599 Pivit10851 Pivit11238 Pivit11238 Pivit11238	HXLR RXLR RXYR RXYR RXLR RXLR RXLR RXLR R	87 99 124 81 86 82 52 42 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 1115 82 1115 82 1112 82 1118 92 73 67 59	PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit02817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit08433 gPlvit007288 gPlvit06818 gPlvit06356 gPlvit128192 gPlvit006356 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit007639 gPlvit07639 gPlvit07639 gPlvit07261 gPlvit07261 gPlvit09005 gPlvit07261 gPlvit0905 gPlvit07261 gPlvit09909 gPlvit078505 gPlvit07846	Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057048 Plvit057048 Plvit059657 Plvit060293 Plvit060235 Plvit063126 Plvit063126 Plvit064197 Plvit063126 Plvit064197 Plvit064197 Plvit065039 Plvit0064197 Plvit064197 Plvit07403 Plvit102906 Plvit104449 Plvit107403 Plvit107403 Plvit108598 Plvit108689 Plvit108689 Plvit108689 Plvit118820 Plvit112829 Plvit112829 Plvit112829 Plvit115019 Plvit116383	HXLR RXLR RXYR RXYR RXLR RXLR RXLR RXLR R	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 112 82 112 82 73 67 59 56	PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit01994 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit00366 gPlvit142412 Bad hit gPlvit003676 gPlvit142412 gPlvit003676 gPlvit142422 gPlvit003676 gPlvit03275 gPlvit012475 gPlvit091909 gPlvit091909 gPlvit091909 gPlvit091909 gPlvit093505 gPlvit11582 gPlvit00402	Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit059657 Pivit060293 Pivit060293 Pivit06128 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063127 Pivit063126 Pivit063126 Pivit06329 Pivit06329 Pivit065039 Pivit065039 Pivit0740 Pivit102906 Pivit102906 Pivit10740 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108251 Pivit10251 Pivit11238 Pivit112251 Pivit112251 Pivit112519 Pivit115019 Pivit118111 Pivit118717	HXLR RXLR RXYR RXYR RXFR RXLQ RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 112 82 118 92 73 67 59 56 66	PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit01994 gPlvit02817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit128192 gPlvit128192 gPlvit142412 Bad hit gPlvit142412 Bad hit gPlvit103676 gPlvit149232 gPlvit003676 gPlvit149232 gPlvit03761 gPlvit02475 gPlvit02475 gPlvit0287505 gPlvit11582 gPlvit037505 gPlvit11582 gPlvit02364 gPlvit006815	Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057576 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit060293 Pivit060293 Pivit060293 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit064197 Pivit096745 Pivit09745 Pivit102906 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit10851 Pivit11238 Pivit116383 Pivit116383 Pivit116383 Pivit118717 Pivit118717	HXLR RXLR RXYR RXYR RXLR RXLR RXLR RXLR R	87 99 124 81 86 82 52 42 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 115 82 112 82 58 47 58 47 58 47 58 58 58 47 58 58 58 58 58 58 58 58 58 58 58 58 58	PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit01994 gPlvit02817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit08483 gPlvit007288 gPlvit06818 gPlvit128192 gPlvit006356 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit007639 gPlvit07639 gPlvit07639 gPlvit0761 gPlvit0761 gPlvit0761 gPlvit078505 gPlvit07846 gPlvit07846 gPlvit023464 gPlvit023464 gPlvit00402 gPlvit07676	Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit059657 Pivit060233 Pivit060616 Pivit06138 Pivit063126 Pivit064197 Pivit063126 Pivit064197 Pivit064197 Pivit064197 Pivit064197 Pivit064197 Pivit096745 Pivit102906 Pivit102906 Pivit104449 Pivit107403 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108689 Pivit108689 Pivit108689 Pivit108598 Pivit108598 Pivit112829 Pivit112829 Pivit112829 Pivit11633 Pivit118111 Pivit118717 Pivit121675	HXLR RXLR RXYR RXYR RXLR RXLR RXLR RXLR R	87 99 124 81 81 86 82 52 42 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 112 82 112 82 73 67 59 56 66 74 74	PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit01994 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit05604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit007289 gPlvit007639 gPlvit007639 gPlvit007639 gPlvit007639 gPlvit007639 gPlvit047261 gPlvit047261 gPlvit047261 gPlvit04755 gPlvit04755 gPlvit091909 gPlvit091909 gPlvit091909 gPlvit091909 gPlvit093505 gPlvit11582 gPlvit004042 gPlvit000402 gPlvit006815 gPlvit07466	Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit060293 Pivit060293 Pivit060293 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit06329 Pivit06539 Pivit06539 Pivit06539 Pivit06539 Pivit0740 Pivit102906 Pivit108298 Pivit108298 Pivit108298 Pivit108251 Pivit11238 Pivit11238 Pivit11239 Pivit115019 Pivit118717 Pivit12675 Pivit129209	HXLR RXLR RXYR RXYR RXFR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 86 82 77 82 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 118 92 73 67 59 56 66 74 72	PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit01994 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit128192 gPlvit128192 gPlvit07288 gPlvit128192 gPlvit07387 gPlvit003676 gPlvit142412 Bad hit gPlvit003676 gPlvit037676 gPlvit012475 gPlvit024615 gPlvit06815 gPlvit071676 gPlvit071676 gPlvit07676	Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit060293 Pivit060293 Pivit060293 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit064197 Pivit065039 Pivit096745 Pivit09745 Pivit09745 Pivit109740 Pivit108598 Pivit10820 Pivit12829 Pivit12929 Pivit130290 Pivit130290 Pivit130290 Pivit130290	HXLR RXLR RXYR RXYR RXFR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 82 52 52 42 52 66 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 115 82 112 82 58 47 59 58 47 59 55 59 56 66 74 74 74 78	PatScan PatScan	yes yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit042817 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit06818 gPlvit06356 gPlvit128192 gPlvit006356 gPlvit142412 Bad hit gPlvit006356 gPlvit14229 gPlvit007639 gPlvit07639 gPlvit07261 gPlvit07261 gPlvit07261 gPlvit07261 gPlvit078505 gPlvit078464 gPlvit091909 gPlvit023464 gPlvit023464 gPlvit073378	Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit059657 Pivit060233 Pivit060235 Pivit063126 Pivit063126 Pivit064197 Pivit064197 Pivit064197 Pivit064197 Pivit064197 Pivit064197 Pivit07403 Pivit102906 Pivit104449 Pivit107403 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108689 Pivit108689 Pivit108689 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit108598 Pivit112829 Pivit11633 Pivit118111 Pivit121675 Pivit129299 Pivit130290 Pivit13303	HXLR RXLR RXYR RXYR RXLR RXLR RXLR RXLR R	87 99 124 81 82 52 52 42 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 112 82 112 82 73 67 59 56 66 74 74 78 65	PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit01994 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit05604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit00738 gPlvit00735 gPlvit047261 gPlvit047232 gPlvit007639 gPlvit047261 gPlvit047261 gPlvit04725 gPlvit04755 gPlvit047955 gPlvit091909 gPlvit091909 gPlvit091909 gPlvit09109 gPlvit087505 gPlvit11582 gPlvit0046815 gPlvit073378 Negative	Discard Discard	
Pivit056756 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit057048 Pivit059657 Pivit060293 Pivit060293 Pivit06128 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit063126 Pivit06329 Pivit06329 Pivit065039 Pivit065039 Pivit0740 Pivit0740 Pivit102906 Pivit10251 Pivit108298 Pivit108298 Pivit108298 Pivit10251 Pivit10251 Pivit12829 Pivit118319 Pivit118519 Pivit118517 Pivit12675 Pivit129299 Pivit133303 Pivit137134	HXLR RXLR RXYR RXYR RXFR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 86 82 52 42 66 44 59 112 80 58 47 115 82 112 82 118 92 73 67 59 56 66 74 74 74 78 65 37	PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit01994 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit055810 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit07288 gPlvit128192 gPlvit07288 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit003676 gPlvit142412 gPlvit003676 gPlvit142412 gPlvit003676 gPlvit037505 gPlvit012475 gPlvit06815 gPlvit07505 gPlvit06815 gPlvit071676 gPlvit07378 Negative gPlvit07378	Discard Discard	
Pivit056744 Plvit056756 Plvit057048 Plvit057048 Plvit057048 Plvit057048 Plvit060293 Plvit060293 Plvit060293 Plvit06126 Plvit063126 Plvit063126 Plvit063126 Plvit063126 Plvit063126 Plvit063126 Plvit063126 Plvit064197 Plvit09745 Plvit109745 Plvit109745 Plvit109740 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit108598 Plvit11229 Plvit11233 Plvit1187134 Plvit137134 Plvit143296	HXLR RXLR RXYR RXYR RXFR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXLR RXL	87 99 124 81 82 52 52 42 52 66 44 59 112 80 58 47 112 80 58 47 112 82 112 82 112 82 112 82 53 54 67 59 55 56 66 74 74 74 78 65 37 32	PatScan PatScan	yes	gPlvit047707 gPlvit010994 gPlvit01994 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit056604 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit02917 gPlvit007288 gPlvit007288 gPlvit06356 gPlvit128192 gPlvit006356 gPlvit142412 Bad hit gPlvit104229 gPlvit007639 gPlvit007639 gPlvit07661 gPlvit07261 gPlvit07261 gPlvit07261 gPlvit079109 gPlvit07375 gPlvit023464 gPlvit023464 gPlvit073378 Negative gPlvit073378	Discard Discard	

Plvit146667 RXLR 42 PatScan gPlvit000368 Discard a accession number of cDNA sequence, <sup>b</sup> RxLR motif, <sup>c</sup> sequence size in amino acids, <sup>d</sup> detection method that led to the identification of the candidate gene, <sup>e</sup> the 26 sequences that were selected at the first time (complete sequence and no blast with known protein of P. infestans), <sup>f</sup> gDNA sequence corresponding to each cDNA sequence, <sup>g</sup> the 51 cDNA sequences that were confirmed by gDNA sequences, <sup>h</sup> accession number (cDNA) for
which gDNA sequences are common, <sup>i</sup> number of complete sequences among ADNg sequences identified, <sup>j</sup> name of candidate genes tested for PCR amplification on the reference isolate, Pv221.

Tableau S2 : Caractéristiques des isolats de *P. viticola* utilisés pour l'étude préliminaire d'amplification de 24 gènes candidats.

[Table S2 : Caracteristics of *P. viticola* isolates used for preliminary amplification of 24 candidats genes.]

		P. viticola	Virulent/ avirulent on	
Isolate	Host of origin	species	Regent	Collecting site
SC	V. vinifera	В	Avirulent	Colmar, France
Pv340	V. vinifera	В	Avirulent	Tolcsva, Hongary
SL	Regent	В	Virulent	Lednice, Czech Republic
Pv125	Regent	В	Virulent	Pècs, Hongary
MSU1097	V. vinifera	В	na	Clarksville, Michigan, USA
VA245	V. vinifera	В	na	Hidden Brook, Virginia, USA
WV10	V. aestivalis	В	na	Convington, West Viriginia, USA
MSU1286	V. labrusca	В	na	Clarksville, Michigan, USA
	V. vinifera	С	na	Clarksville, Michigan, USA
	V. riparia	А	na	Clarksville, Michigan, USA

- Chapitre 3 : Identification et caractérisation d'effecteurs candidats de Plasmopara viticola impliqués dans la virulence -



- Discussion générale-

## La plante-hôte, facteur de spéciation dans les populations sauvages de mildiou de la vigne

La spécialisation par la plante-hôte (adaptation à l'hôte) peut, de manière pléiotropique, conduire à un isolement reproducteur et donc à la spéciation des pathogènes (Giraud *et al.* 2010). Certains traits d'histoire de vie favorisent cette spéciation écologique, notamment la biotrophie obligatoire qui impose au pathogène de se reproduire sur l'hôte, ce qui limite la migration entre le développement et la reproduction du pathogène. La spécialisation plante-hôte mise en évidence au sein des espèces cryptiques de mildiou de la vigne va dans le sens des prédictions de ce modèle. En effet, en conditions contrôlées et en conditions naturelles, les espèces de mildiou A et D sont spécialisées sur leur plante-hôte, respectivement *V. riparia* et *P. quinquefolia*. Pour les espèces B et C, malgré leur gamme d'hôtes plus large, le processus de spécialisation est en cours. Par exemple, l'espèce C qui est capable d'infecter *V. labrusca* en conditions contrôlées, n'est jamais présente sur cette plante-hôte en conditions naturelles.

Dans les conditions naturelles, les agents pathogènes s'adaptent pour développer un arsenal capable d'infecter l'hôte, et l'hôte s'adapte en retour pour optimiser ses systèmes de défense contre l'agent pathogène conduisant à la coévolution entre l'hôte et l'agent pathogène. Sur le long terme, la coévolution hôte-pathogène conduit à la co-spéciation des espèces du pathogène et de l'hôte, une situation détectable par l'analyse de la congruence entre les phylogénies de l'hôte et du parasite. Les études de coévolution entre les plantes et les pathogènes fongiques dans les populations naturelles sont relativement peu fréquentes (Burdon et Thrall 2009). A ce propos, nous pouvons noter l'étude qui concerne les espèces de Microbotryum et ses hôtes, les Caryophylacées. Dans ce cas, il a été montré que la diversification et la spécialisation des espèces de pathogènes étaient majoritairement liées à des sauts d'hôtes plutôt qu'à des évènements de cospéciation (Refregier *et al.* 2008). Dans le cas de l'interaction entre P. viticola et les Vitis spp., il serait donc intéressant d'évaluer l'impact des sauts d'hôtes et de la cospéciation sur la diversification des espèces du pathogène. Sur la base de nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que le saut d'hôte est probablement un mécanisme important dans la diversification de P. viticola. En effet, la grande distance phylogénétique entre Parthenocissus quinquefolia et les autres espèces de Vitis ne semble pas congruente avec la forte proximité phylogénétique de l'espèce D (qui est spécialisée sur *P. quinquefolia*) par rapport aux autres espèces de mildiou. L'importance des sauts d'hôtes dans ce pathosystème est aussi illustrée par l'histoire récente du mildiou avec la

vigne cultivée (*V. vinifera*). En effet, l'invasion du mildiou en Europe correspond en réalité à un saut d'hôte sur *Vitis vinifera*, l'espèce de vigne eurasiatique. De même, un ou plusieurs sauts d'hôtes du compartiment sauvage vers le compartiment cultivé ont bien eu lieu suite à l'utilisation des hybrides interspécifiques cultivés (en Europe et en Amérique du Nord). La reconstruction de phylogénies robustes des *Vitis* spp. et des espèces de mildiou, basées sur l'utilisation d'un grand nombre de gènes permettrait de tester l'hypothèse d'une co-spéciation entre l'hôte et le parasite.

Chez le mildiou de la vigne, la spéciation écologique (liée à la plante hôte) observée au niveau spécifique n'a pas pu être confirmée à l'échelle intraspécifique. Pourtant, des barrières aux flux de gènes ont été décrites chez d'autres espèces de pathogènes de plantes (Couch *et al.* 2005, Fournier et Giraud 2008). Par exemple, au sein du Groupe II de *B. cinerea*, les populations de Botrytis présentes sur ronces et sur vignes en sympatrie sont significativement différenciées. De plus, d'après leurs génotypes, les souches se rassemblent en deux groupes en fonction de leur plante-hôte d'origine confirmant l'existence de flux de gènes réduits (Fournier et Giraud 2008). Chez le mildiou de la vigne, aucune différenciation liée à la plante-hôte ou même à la géographie n'existe au sein des populations de l'espèce C. Ceci peut s'expliquer par de forts flux de gènes correspondant à des tailles efficaces de populations élevées. A l'échelle du Nord-Est américain, la différenciation génétique observée au sein de l'espèce B ne semble pas non plus liée à une spécialisation par la plante-hôte. Cependant, nos données indiquent l'existence d'une rupture de flux de gènes entre les populations de *V. labrusca* et des autres plantes-hôtes dans le Michigan, résultant probablement de l'adaptation du mildiou aux 'labrusca' cultivés dans cette région (Concord et Niagara).

#### Conquête des hôtes cultivés et modification du pouvoir pathogène

Les maladies sont qualifiées d'émergentes lorsqu'elles sont récemment devenues un sujet de préoccupation en raison d'une augmentation de la virulence, de l'infection d'un nouvel hôte, et/ou de son apparition dans une nouvelle région (Anderson *et al.* 2004). L'émergence des agents pathogènes dans les agro-écosystèmes a récemment fait l'objet d'une revue par Stukenbrock et McDonald (2008). Les auteurs détaillent les différents mécanismes évolutifs qui peuvent conduire à l'émergence des agents pathogènes dans les agro-écosystèmes : le "host-tracking", l'hybridation, le transfert horizontal de gènes et le saut d'hôte (incluant l'expansion de la gamme d'hôte). Les plantes sauvages sont une source d'agents pathogènes

pour les plantes cultivées et la mise en contact des populations d'agents pathogènes de plantes sauvages avec les zones cultivées favorise les sauts d'hôtes. Ce scénario d'émergence est à l'origine des populations de mildiou au vignoble : en Amérique du Nord, les hybrides interspécifiques de vigne et les cultivars de *V. vinifera* et de *V. labrusca* ont été infectés par les populations de mildiou présentes sur les espèces sauvages (probablement *V. aestivalis, V. riparia*). En Europe, le saut d'hôte vers *V. vinifera* a été favorisé par l'activité humaine (importation de matériel végétal) qui a conduit à disperser l'agent pathogène au-delà de ses capacités de dispersion intrinsèque. Nous avons montré qu'il y avait émergence de nouveaux pathotypes au sein des populations de mildiou européen en lien avec l'utilisation des variétés résistantes encore faiblement réparties sur le territoire.

L'émergence de nouvelles populations d'agents pathogènes peut s'accompagner de fortes modifications du pouvoir pathogène, à la fois en terme de virulence et d'agressivité. Concernant la virulence, il a été montré que dans les agrosystèmes, les sauts d'hôtes peuvent conduire à une spéciation rapide des agents pathogènes (Couch *et al.* 2005, Zaffarano *et al.* 2008). Par exemple, les sauts d'hôtes au sein des populations de *Rhynchosporium secalis* entre ses plantes-hôtes (l'orge, le seigle et les *Agropyron* spp.) ont été rapidement suivis d'une spéciation par spécialisation plante-hôte (Zaffarano *et al.* 2008). Dans le cas de *P. viticola*, nous n'avons pas observé de modification de la virulence suite à son saut d'hôte depuis les hôtes « ancestraux » (*V. riparia, V. aestivalis*) vers les nouveaux hôtes cultivés (Chancellor, *V. labrusca, V. vinifera*). Les isolats de *P. viticola* collectés sur le nouvel hôte ancestral ne sont pas systématiquement virulents sur l'hôte ancestral. L'inverse n'est pas vrai car les isolats présents sur l'hôte ancestral ne sont pas systématiquement virulents sur le nouvel hôte (exemple : *V. aestivalis*, *V. vinifera*). A la seule exception de l'espèce B dans le Michigan, cette absence de spéciation après le saut d'hôte depuis les hôtes sauvages vers les hôtes cultivés set confirmée par le défaut de structure génétique au sein des espèces B et C en fonction des plantes-hôtes.

Concernant l'agressivité, Stukenbrock et McDonald (2008) postulent que l'absence de coévolution entre l'agent pathogène et son hôte induit une résistance faible de l'hôte nouvellement colonisé et une forte agressivité de l'agent pathogène sur son hôte. L'agressivité des populations de pathogènes est renforcée par l'homogénéité génétique et la densité des hôtes présents dans les agro-écosystèmes (Stukenbrock 2008). Dans le cas du mildiou de la vigne, le passage de l'espèce B sur *V. vinifera* a effectivement conduit (en Europe) à des épidémies très sévères de mildiou sur cette espèce qui n'avait pas coévoluée avec le pathogène ('plante naïve'). Nous remarquons toutefois que si la vigne cultivée est très sensible aux espèces B et C, elle présente en revanche un fort niveau de résistance à l'espèce A (réaction d'hypersensibilité) et ce malgré l'absence de coévolution. Les expériences d'inoculations croisées réalisées en Amérique montrent en outre que l'agent pathogène s'est adapté aux espèces cultivées. Un niveau élevé de maladie est en effet obtenu sur les espèces cultivées par rapport aux espèces sauvages pour les isolats collectés sur les espèces cultivés. Cette augmentation d'agressivité pourrait s'expliquer par le fait que les populations d'agents pathogènes s'adaptent à la plante la plus courante dans le paysage, les plantes cultivées.

Un phénomène similaire est observé en Europe où les populations de mildiou en interaction avec les gènes de résistance de la vigne répondent aux déploiements des résistances partielles par l'évolution de virulences et par une augmentation de l'agressivité. L'adaptation aux résistances quantitatives a été observée dans d'autres pathosystèmes comme par exemple chez le mildiou de la pomme de terre sur la variété Désirée (Andrivon *et al.* 2007). Cependant, les résultats sont un peu différents car l'adaptation du mildiou de la vigne ne s'accompagne pas d'un trade-off en fonction de la plante infectée. En effet, les isolats sont plus agressifs quelque soit l'hôte considéré : la variété résistante d'origine, mais aussi les autres plantes résistantes et les plantes sensibles (par rapport aux isolats « naïfs »). Ces résultats sont en accord avec le modèle développé par Gandon et Mickalakis (2000) qui prédit que sur les variétés à résistance de l'hôte, provoquant une augmentation de l'agressivité sur l'hôte sensible.

#### Implications pour l'épidémiologie du mildiou au vignoble

L'existence de différentes espèces cryptiques aux Etats-Unis pose un certain nombre de questions quand à la gestion du mildiou dans cette région du monde. La première question concerne l'initiation des épidémies : le compartiment sauvage agit-il comme un réservoir pour les épidémies du compartiment cultivé ('spillover') ? L'hypothèse du réservoir semble peut probable dans le cas du mildiou de la vigne pour plusieurs raisons. Les espèces sauvages telles que *V. aestivalis, V. cinera ou V. vulpina* sont distribuées en patchs constitués de peu d'individus que l'on trouve parfois aux abords des vignobles. De plus, les épidémies sur les espèces cultivées conduisent à des niveaux d'attaque très élevés incompatibles avec la faible quantité de symptômes observés sur les variétés sauvages. Un autre indice fournit par nos données est que dans la région du Michigan les isolats présents sur les espèces sauvages sont génétiquement très différentiés des populations trouvées sur les plantes cultivées. Au final, il

est donc peu probable que les épidémies de mildiou présentes sur les espèces cultivées proviennent des espèces sauvages. Plus vraisemblablement, les populations de mildiou en vignoble se maintiennent d'une année sur l'autre et les épidémies sont la conséquence d'une contamination par les oospores qui hivernent dans les sols viticoles (Kenelly *et al.* 2007). Une autre question concerne l'impact de la variabilité génétique du pathogène sur les épidémies : les épidémies sont-elle les mêmes selon qu'il s'agit d'une attaque sur Chancellor (espèce A), sur *V. vinifera* (espèce B ou C) et bien *V. labrusca* (espèce B)? Existe-t-il des faciès épidémiques différents selon les espèces cryptiques ? Pour répondre à cette question, il conviendrait d'étudier l'épidémiologie du mildiou en prenant en compte la diversité qui a été mise en évidence dans nos résultats. Ce type d'approche a déjà permis de mettre en évidence des différentes de distribution temporelle entre des génotypes différents chez d'autres pathogènes de la vigne, i.e. oïdium de la vigne (*Erisyphe necator*), Botrytis (Montarry *et al.* 2008).

Même s'il est difficile d'imaginer ce que serait une viticulture basée sur l'utilisation des variétés résistantes en Europe, nos données apportent quelques pistes de réflexion sur les conséquences de ces déploiements sur la gestion de la maladie au vignoble. Il faut tout d'abord rappeler qu'à l'heure actuelle, nous disposons de très peu de données sur l'épidémiologie du mildiou dans des systèmes viticoles basés sur du matériel végétal résistant. De même, nous ignorons presque tout des capacités du pathogène à accomplir son cycle sur ces variétés à résistances partielles, notamment la reproduction sexuée. Des trade-off ont par exemple été décrits entre agressivité et survie hivernale dans le cas du mildiou de la pomme de terre (Montarry et al. 2007). De plus, les travaux de recherche (les nôtres inclus), par commodité, focalisent tous sur l'efficacité de la résistance des feuilles de la vigne, alors qu'en fait ce sont les grappes qui constituent la récolte. La question de la résistance intrinsèque des grappes et/ou de la protection de ces organes par la résistance des feuilles reste entière. Enfin, nos données montrent que le déploiement de la résistance risque de s'accompagner d'une augmentation générale de l'agressivité des populations de l'agent pathogène sans que l'on sache l'impact que cela pourrait avoir sur l'épidémiologie du mildiou au vignoble. Des travaux sont donc aujourd'hui nécessaires pour comprendre la dynamique des épidémies de mildiou de ces nouveaux systèmes viticoles afin de construire les itinéraires de protection du vignoble les plus adéquats à l'utilisation des résistances de la plante.

#### Vers une gestion durable de la résistance de la vigne

La situation particulière de la vigne en Europe, exclusivement composée de variétés sensibles, fait de ce pathosystème un modèle de choix pour étudier l'impact des résistances sur les populations de pathogènes. Nous sommes en effet en train d'assister en direct à l'apparition de nouvelles populations de mildiou liée au déploiement de ces nouvelles résistances. MacDonald et Linde (2002) font l'hypothèse qu'il est possible de prédire la durabilité d'une résistance sur la base de l'étude du potentiel évolutif de l'agent pathogène, évalué de manière indirecte à partir de ses caractéristiques génétiques. Dans cette thèse, nous avons montré que les populations de mildiou tendent à être panmictiques ce qui indique que la phase sexuée de reproduction de l'agent pathogène est efficace pour redistribuer la variabilité génétique dans les génotypes. De plus, nous avons observé une très faible structuration géographique (Nord-Est américain, Europe) en lien avec des tailles efficaces de populations importantes. *P. viticola* possède donc un potentiel évolutif élevé induisant une capacité d'adaptation rapide à son environnement.

Cette prédiction semble se confirmer en Europe où nous avons mis en évidence de nouveaux évènements de contournements pour plusieurs résistances partielles de la vigne. Le contournement rapide des résistances partielles peut s'expliquer par le fait que le QTL de résistance tel que *Rpv3* est déterminé par un gène majeur et du point de vu mécanistique s'apparente donc à de la résistance qualitative. Les contournements ne sont pas accompagnés d'une diminution de l'agressivité indiquant une absence de coût associé à la virulence. Ainsi, dans le cas du mildiou de la vigne, nous n'observons pas de trade-off entre sporulation et virulence comme pour l'agent pathogène de la rouille du lin (Thrall et Burdon 2003).

Au contraire, la capacité à se développer sur une variété résistante s'accompagne d'une augmentation de l'agressivité (qu'il y ait eu contournement de résistance ou non). En effet, dans le cas des variétés non contournées (Bronner, Solaris) qui présentent également un QTL de résistance majeur (Rpv10), nous observons une érosion de la résistance face aux isolats issus des variétés résistantes. L'augmentation de l'agressivité des isolats nous alerte sur la durabilité limitée de l'efficacité de ces résistances partielles à moyen ou long terme. Des études récentes ont montré que la stratégie de pyramidage cumulant des gènes de résistance qualitatifs avec des résistances quantitatives était plus durable que l'utilisation des gènes seuls (Palloix *et al.* 2009, Brun *et al.* 2010). La stratégie de pyramidage est particulièrement pertinente dans le cas d'une plante pérenne comme la vigne, amenée à être plantée pour plusieurs décennies, et c'est donc cette stratégie qui a été retenue dans les programmes

d'amélioration de l'INRA. L'idéal pour assurer la durabilité des résistances au mildiou, serait donc non seulement de cumuler plusieurs gènes de résistance mais aussi de faire en sorte que ces gènes aient des impacts différents sur les traits de vie de l'agent pathogène. Un autre facteur à tenir en compte pour garantir la durabilité des résistances est de choisir des gènes qui reconnaissent des effecteurs conservés dans les populations du pathogène ; dans ce contexte les effecteurs RxLR conservés entre les différentes espèces de *P. viticola* sont des bons candidats pour rechercher des gènes de résistance potentiellement durables.

La recherche des traits impliqués dans l'adaptation et l'analyse des trade-off entre ces traits est une étape importante pour identifier les phases du cycle de vie du pathogène qui sont contraintes par la plante-hôte et les stratégies évolutives adoptées par le pathogène en retour. Nos travaux montrent que l'adaptation des populations de mildiou aux variétés résistantes se traduit par une diminution du temps de latence ainsi qu'une augmentation de la sporulation (avec trade-off sur la taille des sporanges). Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces modifications, il serait utile de connaître l'architecture génétique de ces traits. L'une des approches possibles pour y parvenir est de rechercher des modifications génétiques au niveau de gènes candidats, notamment les effecteurs. En effet, les effecteurs sont connus pour être impliqués dans les processus de résistance (R-Avr) mais aussi dans les processus d'expansion de la gamme d'hôtes des pathogènes (Schulze-Lefert et Panstruga 2011). La génomique des populations est une autre approche qui permettrait d'étudier la dynamique évolutive des facteurs génétiques responsables de l'adaptation des agents pathogènes à leurs plantes-hôtes.

Nos travaux ont enfin des répercussions sur l'identification des facteurs de résistance chez la vigne. En effet, les données acquises sur la variabilité des populations de mildiou aussi bien au niveau génétique que phénotypique nous incitent à modifier la façon dont est conduite l'évaluation de la résistance de la vigne en amont des programmes d'amélioration (étape de screening des sources de résistances). En effet, l'identification de sources de résistance est réalisée à l'aide d'un faible nombre d'isolats de mildiou qui ne reflète par la diversité maintenant décrite dans les populations. Modifier les procédures en incluant une vaste gamme d'isolats - espèces de mildiou et pathotypes – permettrait de s'assurer de l'efficacité des résistances même en cas de nouvelles introductions de mildiou en Europe (on sait en particulier que l'espèce C est présente sur *V. vinifera* en Amérique du Nord). Pour cela, nous devons réaliser une core-collection d'isolats de mildiou. Cependant, les espèces de mildiou qui ne sont pas présentes sur le territoire européen, ne peuvent pas être importées en Europe

(au risque de provoquer une nouvelle invasion de manière accidentelle). Ceci ne pourra donc se faire sans utiliser un laboratoire de quarantaine, ce qui constitue un frein important à la constitution d'une telle collection. En parallèle, la mise en évidence de pathotypes chez le mildiou de la vigne pose la question de la mise en œuvre d'une gamme d'hôte pour déterminer les profils de virulence chez cette espèce. A l'instar de ce qui se fait déjà pour d'autres oomycètes biotrophes obligatoires (mildiou du tournesol ou de la laitue), un projet est actuellement en cours à l'INRA pour proposer une procédure pour la caractérisation des pathotypes chez le mildiou de la vigne.



#### Références

- Abdelkrim, J., B. C. Robertson, J. O. L. Stanton, and N. J. Gemmell. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. Biotechniques 46(3): 185-191.
- Aguileta G, Refregier G, Yockteng R, Fournier E, Giraud T. 2009. Rapidly evolving genes in pathogens: Methods for detecting positive selection and examples among fungi, bacteria, viruses and protists Discussion. *Infection Genetics and Evolution* **9**(4): 656-670.
- Ahmed HU, Mundt CC, Hoffer ME, Coakley SM. 1996. Selective influence of wheat cultivars on pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola* (Anamorph *Septoria tritici*). *Phytopathology* 86(5): 454-458.
- Allen RL, Bittner-Eddy PD, Grenvitte-Briggs LJ, Meitz JC, Rehmany AP, Rose LE, Beynon JL. 2004. Host-parasite coevolutionary conflict between Arabidopsis and downy mildew. *Science* 306(5703): 1957-1960.
- Anderson RM, May RM. 1982. Coevolution of hosts and parasites. Parasitology 85: 411-426.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**(10): 535-544.
- Andrivon D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbiere R, Achbani EH, Pelle R, Ellisseche D. 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: Evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* **97**(3): 338-343.
- Anisimova M, Liberles DA. 2007. The quest for natural selection in the age of comparative genomics. *Heredity* **99**(6): 567-579.
- Armstrong MR, Whisson SC, Pritchard L, Bos JIB, Venter E, Avrova AO, Rehmany AP, Bohme U, Brooks K, Cherevach I, et al. 2005. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene Avr3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(21): 7766-7771.
- Ayme V, Petit-Pierre J, Souche S, Palloix A, Moury B. 2007. Molecular dissection of the potato virus YVPg virulence factor reveals complex adaptations to the pvr2 resistance allelic series in pepper. *Journal of General Virology* 88: 1594-1601.
- Bailey K, Cevik V, Holton N, Byrne-Richardson J, Sohn KH, Coates M, Woods-Toer A, Aksoy HM, Hughes L, Baxter L, Jones JDG, Beynon J, Holub EB, Toer M. 2011. Molecular Cloning of ATR5(Emoy2) from *Hyaloperonospora arabidopsidis*, an Avirulence Determinant That Triggers RPP5-Mediated Defense in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(7): 827-838.
- Ballini E, Morel J-B, Droc G, Price A, Courtois B, Notteghem J-L, Tharreau D. 2008. A genomewide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**(7): 859-868.
- Ballvora A, Ercolano MR, Weiss J, Meksem K, Bormann CA, Oberhagemann P, Salamini F, Gebhardt C. 2002. The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant Journal* **30**(3): 361-371.
- Bart R, Cohn M, Kassen A, McCallum EJ, Shybut M, Petriello A, Krasileva K, Dahlbeck D, Medina C, Alicai T, Kumar L, et al. 2012. High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance (vol. 109, pg E1972, 2012). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109(32): 13130-13130.
- Baxter L, Tripathy S, Ishaque N, Boot N, Cabral A, Kemen E, Thines M, Ah-Fong A, Anderson R, Badejoko et al.2010. Signatures of Adaptation to Obligate Biotrophy in the Hyaloperonospora arabidopsidis Genome. *Science* **330**(6010): 1549-1551.
- Bellin D, Peressotti E, Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Adam-Blondon A-F, Cipriani G, Morgante M, Testolin R, Di Gaspero G. 2009. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theoretical and Applied Genetics* **120**(1): 163-176.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, F. Bonhomme. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations,

Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France). (program available from: http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm)

Berlese AN, De Toni JB. 1888. Fischer, Syll. fung. (Abellini) 7: 239.

- Bhattacharjee S, Hiller NL, Liolios K, Win J, Kanneganti T-D, Young C, Kamoun S, Haldar K. 2006. The malarial host-targeting signal is conserved in the Irish potato famine pathogen. *PLoS pathogens* 2(5): 453-465.
- Birch PRJ, Boevink PC, Gilroy EM, Hein I, Pritchard L, Whisson SC. 2008. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **11**(4): 373-379.
- Birch PRJ, Rehmany AP, Pritchard L, Kamoun S, Beynon JL. 2006. Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends in Microbiology* **14**(1): 8-11.
- Bittner-Eddy PD, Crute IR, Holub EB, Beynon JL. 2000. RPP13 is a simple locus in *Arabidopsis thaliana* for alleles that specify downy mildew resistance to different avirulence determinants in Peronospora parasitica. *Plant Journal* 21(2): 177-188.
- Blaeser M, Weltzien HC. 1979. epidemiological-studies to improve the control of grapevine downy mildew (*plasmopara-viticola*). Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection **86**(8): 489-498.
- Blasi P, Blanc S, Wiedemann-Merdinoglu S, Prado E, Ruehl EH, Mestre P, Merdinoglu D. 2011. Construction of a reference linkage map of Vitis amurensis and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical and Applied Genetics* 123(1): 43-53.
- Blasi P. 2010. Analyse génétique comparée de la résistance à Plasmopara viticola chez les espèces apparentées à la vigne. Thèse
- Bonman JM, Bandong JM, Lee YH, Lee EJ. 1989. Race-specific partial resistance to blast in temperate japonica rice cultivars. *Plant Disease* **73**(6): 496-499.
- Botella MA, Parker JE, Frost LN, Bittner-Eddy PD, Beynon JL, Daniels MJ, Holub EB, Jones JDG. 1998. Three genes of the arabidopsis RPP1 complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. *Plant Cell* 10(11): 1847-1860.
- Boutemy LS, King SRF, Win J, Hughes RK, Clarke TA, Blumenschein TMA, Kamoun S, Banfield MJ. 2011. Structures of *Phytophthora* RXLR Effector Proteins a conserved but adaptable fold underpins functional diversity. *Journal of Biological Chemistry* 286(41): 35834-35842.
- Bozkurt TO, Schornack S, Win J, Shindo T, Ilyas M, Oliva R, Cano LM, Jones AME, Huitema E, van der Hoorn RAL, Kamoun S. 2011. *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(51): 20832-20837.
- Brasier C. 2000. Plant pathology The rise of the hybrid fungi. Nature 405(6783): 134-135.
- Brown JKM, Tellier A. 2011. Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 345-367.
- Brun H, Chevre A-M, Fitt BDL, Powers S, Besnard A-L, Ermel M, Huteau V, Marquer B, Eber F, Renard M, Andrivon D. 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**(1): 285-299.
- Burdon JJ, Thrall PH. 2009. Coevolution of Plants and Their Pathogens in Natural Habitats. *Science* 324(5928): 755-756.
- Bush, Meissner. 1883. Illustrated descriptive catalogue of American grape vines; A grape grower's manual. Saint Louis: R.P. Studley & Co.
- Cabral A, Stassen JHM, Seidl MF, Bautor J, Parker JE, Van den Ackerveken G. 2011. Identification of *Hyaloperonospora arabidopsidis* Transcript Sequences Expressed during Infection Reveals Isolate-Specific Effectors. *Plos One* **6**(5).
- Cabral A, Oome S, Sander N, Kufner I, Nurnberger T, Van den Ackerveken G. 2012. Nontoxic Nep1-Like Proteins of the Downy Mildew Pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*: Repression of Necrosis-Inducing Activity by a Surface-Exposed Region. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**(5): 697-708.
- Cadle-Davidson L. 2008. Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Plant Disease* 92(11): 1577-1584.
- Caffier V, Didelot F, Pumo B, Causeur D, Durel CE, Parisi L. 2010. Aggressiveness of eight Venturia inaequalis isolates virulent or avirulent to the major resistance gene Rvi6 on a non-Rvi6 apple cultivar. Plant Pathology 59(6): 1072-1080.
- Calonnec A, Wiedemann-Merdinoglu S, Deliere L, Cartolaro P, Schneider C, Delmotte F. 2012.

The reliability of leaf bioassays for predicting disease resistance on fruit A case study on grapevine resistance to downy and powdery mildew. *Plant Pathology*: DOI: 10.1111/j.1365-3059.2012.02667.x.

- Chakraborty R, Deandrade M, Daiger SP, Budowle B. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in dna typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics* **56**: 45-57.
- Chen SL, Hung CS, Xu JA, Reigstad CS, Magrini V, Sabo A, Blasiar D, Bieri T, Meyer RR, Ozersky P, et al. 2006. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: A comparative genomics approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(15): 5977-5982.
- Chen WJ, Delmotte F, Richard-Cervera S, Douence L, Greif C, Corio-Costet MF. 2007. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew Populations. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(16): 5162-5172.
- Cheng B, Yu X, Ma Z, Dong S, Dou D, Wang Y, Zheng X. 2012. Phytophthora sojae effector Avh331 suppresses the plant defence response by disturbing the MAPK signalling pathway. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **77**(1): 1-9.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**(4): 803-814.
- Choi YJ, Shin HD, Ploch S, Thines M. 2011. Three new phylogenetic lineages are the closest relatives of the widespread species Albugo candida. *Fungal Biology* **115**(7): 598-607.
- Choi YJ, Shin HD, Thines M. 2009. Two novel *Peronospora* species are associated with recent reports of downy mildew on sages. *Mycological Research* **113**: 1340-1350.
- Couch BC, Fudal I, Lebrun MH, Tharreau D, Valent B, van Kim P, Notteghem JL, Kohn LM. 2005. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. *Genetics* **170**(2): 613-630.
- **Cowger C, Mundt CC. 2002.** Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* **92**(6): 624-630.
- Crous PW, Groenewald JZ. 2005. Hosts, species and genotypes: opinions versus data. *Australasian Plant Pathology* **34**: 463-470.
- CSmith CC, Fretwell SD. 1974. The optimal balance between size and number of offspring. *American* Society of Naturalists 108(296): 499-506.
- Cui L, Yin W, Dong S, Wang Y. 2012. Analysis of polymorphism and transcription of the effector gene Avr1b in *Phytophthora sojae* isolates from China virulent to Rps1b. *Molecular Plant Pathology* 13(2): 114-122.
- Damasceno CMB, Bishop JG, Ripoll DR, Win J, Kamoun S, Rose JKC. 2008. Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from *Phytophthora* species suggests coevolution with plant endo-beta-1,3-glucanases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**(6): 820-830.
- Dangl JL, Jones JDG. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**(6839): 826-833.
- **De Bary MA. 1863.** Recherches sur le développement de quelques champignons parasites.
- de Jonge R, Bolton MD, Thomma Bphj. 2011. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology* 14(4): 400-406.
- de Vienne DM, Hood ME, Giraud T. 2009. Phylogenetic determinants of potential host shifts in fungal pathogens. *Journal of Evolutionary Biology* 22(12): 2532-2541.
- Delmotte F, Chen WJ, Richard-Cervera S, Greif C, Papura D, Giresse X, Mondor-Genson G, Corio-Costet MF. 2006. Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. *Molecular Ecology Notes* 6(2): 379-381.
- Delmotte, F., V. Machefer, X. Giresse, S. Richard-Cervera, M. P. Latorse, and R. Beffa. 2011. Characterization of single-nucleotid-polymorphism markers for Plasmopara vitcola, the causal agent of grapevine downy mildew. Applied and Environmental Microbiology 77(21): 7861-7863.
- Di Gaspero G, Copetti D, Coleman C, Castellarin SD, Eibach R, Kozma P, Lacombe T, Gambetta G, Zvyagin A, Cindric P, et al. 2012. Selective sweep at the Rpv3 locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **124**(2): 277-286.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Teh T, Wang CIA, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG. 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 103(23): 8888-8893.

- **Dodds PN, Rathjen JP. 2010.** Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**(8): 539-548.
- Dong S, Kong G, Qutob D, Yu X, Tang J, Kang J, Dai T, Wang H, Gijzen M, Wang Y. 2012. The NLP Toxin Family in *Phytophthora sojae* Includes Rapidly Evolving Groups That Lack Necrosis-Inducing Activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**(7): 896-909.
- Dong S, Qutob D, Tedman-Jones J, Kuflu K, Wang Y, Tyler BM, Gijzen M. 2009. The *Phytophthora sojae* Avirulence Locus Avr3c Encodes a Multi-Copy RXLR Effector with Sequence Polymorphisms among Pathogen Strains. *Plos One* **4**(5).
- Dou D, Kale SD, Wang X, Jiang RHY, Bruce NA, Arredondo FD, Zhang X, Tyler BM. 2008. RXLRmediated entry of Phytophthora sojae effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell* 20(7): 1930-1947.
- **Dowkiw A, Voisin E, Bastien C. 2010.** Potential of Eurasian poplar rust to overcome a major quantitative resistance factor. *Plant Pathology* **59**(3): 523-534.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29(8): 1969-1973.
- Dsouza M, Larsen N, Overbeek R. 1997. Searching for patterns in genomic data. *Trends in Genetics* 13(12): 497-498.
- Dutech, C., J. Enjalbert, E. Fournier, F. Delmotte, B. Barrès, J. Carlier, D. Tharreau, and T. Giraud. 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. Fungal Genetics and Biology 44:933–949.
- **Eitas TK, Dangl JL. 2010.** NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **13**(4): 472-477.
- Elmore JM, Lin Z-JD, Coaker G. 2011. Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Current Opinion in Plant Biology* 14(4): 365-371.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols* 2(4): 953-971.
- **Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**(8): 2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47-50.
- Fabre F, Rousseau E, Mailleret L, Moury B. 2012. Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *New Phytologist* **193**(4): 1064-1075.
- Fisher R, Nolke G, Orecchia M, Fischer R, Schillberg S, Twyman RM 2004. Improvement of grapevine using current biotechnology. In: Sequeria OAd, Sequeira JC eds. *Acta Horticulturae*, 383-390.
- Flor H. 1971. Current Status of gene-for-gene concept. Annual Review of Phtypathology 9: 275-296.
- **Fournier E, Giraud T. 2008.** Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *Journal of Evolutionary Biology* **21**(1): 122-132.
- Fournier E, Giraud T, Albertini C, Brygoo Y. 2005. Partition of the Botrytis cinerea complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* **97**(6): 1251-1267.
- Friesen TL, Stukenbrock EH, Liu Z, Meinhardt S, Ling H, Faris JD, Rasmussen JB, Solomon PS, McDonald BA, Oliver RP. 2006. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics* **38**(8): 953-956.
- Galet P. 2000. Dictionnaire encyclopédique des cépages. Paris, France: Hachette.
- Gandon S, Michalakis Y. 2000. Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 267(1447): 985-990.
- Gao HY, Narayanan NN, Ellison L, Hattacharyya MK. 2005. Two classes of highly similar coiled coil-nucleotide binding-leucine rich repeat genes isolated from the Rps1-k locus encode *Phytophthora* resistance in soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**(10): 1035-1045.
- Garcia-Arenal F, McDonald BA. 2003. An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology* **93**(8): 941-952.
- Garcia-Blazquez G, Goker M, Voglmayr H, Martin MP, Telleria MT, Oberwinkler F. 2008. Phylogeny of *Peronospora*, parasitic on Fabaceae, based on ITS sequences. *Mycological Research* **112**: 502-512.
- Gaulin E, Madoui M-A, Bottin A, Jacquet C, Mathe C, Couloux A, Wincker P, Dumas B. 2008. Transcriptome of Aphanomyces euteiches: New Oomycete Putative Pathogenicity Factors and

Metabolic Pathways. *Plos One* **3**(3).

Gavrilets S. 2004. Fitness Landscapes and the Origin of Species: Princeton University Press.

- Gilroy EM, Breen S, Whisson SC, Squires J, Hein I, Kaczmarek M, Turnbull D, Boevink PC, Lokossou A, Cano LM, Morales J et al. 2011. Presence/absence, differential expression and sequence polymorphisms between PiAVR2 and PiAVR2-like in *Phytophthora infestans* determine virulence on R2 plants. *New Phytologist* **191**(3): 763-776.
- Giraud T, Gladieux P, Gavrilets S. 2010. Linking the emergence of fungal plant diseases with ecological speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 25(7): 387-395.
- Giraud T, Refregier G, Le Gac M, de Vienne DM, Hood ME. 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **45**(6): 791-802.
- Giraud T, Villareal L, Austerlitz F, Le Gac M, Lavigne C. 2006. Importance of the life cycle in sympatric host race formation and speciation of pathogens. *Phytopathology* **96**(3): 280-287.
- Gisi U, Waldner M, Kraus N, Dubuis PH, Sierotzki H. 2007. Inheritance of resistance to carboxylic acid amide (CAA) fungicides in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* **56**(2): 199-208.
- Gladieux P, Guerin F, Giraud T, Caffier V, Lemaire C, Parisi L, Didelot F, Le Cam B. 2011. Emergence of novel fungal pathogens by ecological speciation: importance of the reduced viability of immigrants. *Molecular Ecology* **20**(21): 4521-4532.
- Gladieux P, Zhang X-G, Roldan-Ruiz I, Caffier V, Leroy T, Devaux M, Van Glabeke S, Coart E, Le Cam B. 2010. Evolution of the population structure of *Venturia inaequalis*, the apple scab fungus, associated with the domestication of its host. *Molecular Ecology* **19**(4): 658-674.
- **Gobbin D, Bleyer G, Keil S, Kassemeyer HH, Gessler C. 2007.** Evidence for sporangial dispersal leading to a single infection event and a sudden high incidence of grapevine downy mildew. *Plant Pathology* **56**(5): 843-847.
- Gobbin D, Jermini M, Loskill B, Pertot I, Raynal M, Gessler C. 2005. Importance of secondary inoculum of *Plasmopara viticola* to epidemics of grapevine downy mildew. *Plant Pathology* 54(4): 522-534.
- **Gobbin, D., I. Pertot, and C. Gessler. 2003.** Identification of microsatellite markers for Plasmopara viticola and establishment of high throughput method for SSR analysis. European Journal of Plant Pathology 109: 153-164.
- Goker M, Garcia-Blazquez G, Voglmayr H, Telleria MT, Martin MP. 2009. Molecular Taxonomy of Phytopathogenic Fungi: A Case Study in *Peronospora*. *Plos One* **4**(7).
- **Golovina NP. 1955.** Comparatio Speciminum Plasmopara viticola Berl. et de Toni e Regionibus Variis. 138-144.
- Gout L, Kuhn ML, Vincenot L, Bernard-Samain S, Cattolico L, Barbetti M, Moreno-Rico O, Balesdent MH, Rouxel T. 2007. Genome structure impacts molecular evolution at the AvrLm1 avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology* 9(12): 2978-2992.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 221-224.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**(5): 696-704.
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RHY, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, et al. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**(7262): 393-398.
- Hamilton WD, Axelrod R, Tanese R. 1990. Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87(9): 3566-3573.
- Hamon C, Baranger A, Miteul H, Lecointe R, Le Goff I, Deniot G, Onfroy C, Moussart A, Prosperi J-M, Tivoli B, Delourme R, Pilet-Nayel M-L. 2010. A complex genetic network involving a broad-spectrum locus and strain-specific loci controls resistance to different pathotypes of *Aphanomyces euteiches* in Medicago truncatula. *Theoretical and Applied Genetics* 120(5): 955-970.
- Henk DA, Eagle CE, Brown K, Van den Berg MA, Dyer PS, Peterson SW, Fisher MC. 2011. Speciation despite globally overlapping distributions in *Penicillium chrysogenum*: the population genetics of Alexander Fleming's lucky fungus. *Molecular Ecology* 20(20): 4288-4301.
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun S. 2009. Emerging Concepts in Effector

Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(2): 115-122.

- Huang XQ, Roder MS. 2004. Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: A review. *Euphytica* **137**(2): 203-223.
- Huang YJ, Li ZQ, Evans N, Rouxel T, Fitt BDL, Balesdent MH. 2006. Fitness cost associated with loss of the AvrLm4 avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (Phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology* **114**(1): 77-89.
- Hudson RR, Boos DD, Kaplan NL. 1992. A Statistical Test for Detecting Geographic Subdivision. Molecular Biology and Evolution 9(1): 138-151.
- Jaillon O, Aury J-M, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, et al. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**(7161): 463-U465.
- Janzac B, Fabre F, Palloix A, Moury B. 2009. Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Molecular Plant Pathology* **10**(5): 599-610.
- Jiang RHY, Tripathy S, Govers F, Tyler BM. 2008. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(12): 4874-4879.
- Jiang RHY, Tyler BM. 2012. Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **50**: 295-318.
- Johnson H. 1990. Une histoire mondiale du vin de l'antiquité à nos jours. France: Hachette.
- Johnson R. 1979. Concept of durable resistance. *Phytopathology* 69(3): 198-199.
- Jombart T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24(11): 1403-1405.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. Nature 444(7117): 323-329.
- **Jorgensen JH. 1992.** Discovery, characterization and exploitation of MIo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* **63**(1-2): 141-152.
- Joshi A, Thompson JN. 1995. Trade-offs and the evolution of host specialization. *Evolutionary Ecology* 9(1): 82-92.
- Juerges G, Kassemeyer HH, Duerrenberger M, Dueggelin M, Nick P. 2009. The mode of interaction between Vitis and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biology* **11**(6): 886-898.
- Kale SD, Gu B, Capelluto DGS, Dou D, Feldman E, Rumore A, Arredondo FD, Hanlon R, Fudal I, Rouxel T, Lawrence CB, Shan W, Tyler BM. 2010. External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. *Cell* 142(2): 284-295.
- Kamoun S 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 41-60.
- Kang BC, Yeam I, Jahn MM 2005. Genetics of plant virus resistance. Annual Review of *Phytopathology*, 581-621.
- Kemen E, Gardiner A, Schultz-Larsen T, Kemen AC, Balmuth AL, Robert-Seilaniantz A, Bailey K, Holub E, Studholme DJ, MacLean D, Jones JDG. 2011. Gene Gain and Loss during Evolution of Obligate Parasitism in the White Rust Pathogen of Arabidopsis thaliana. Plos Biology 9(7).
- Kennelly MM, Gadoury DM, Wilcox WF, Magarey PA, Seem RC. 2007. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* **97**(4): 512-522.
- Kofler, R., C. Schlötterer, and T. Lelley. 2007. SciRoKo: A new tool for whole genome microsatellite search and investigation. Bioinformatics 23(13): 1683-1685.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer ELL. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305(3): 567-580.
- Lafon, Clerjeau 1998. Downy mildew. In: Press A ed. *Compendium of grape diseases*. Saint Paul, MN, 11-13.
- Langella O 1999. Populations software, 1.2.30.
- Le Gac M, Hood ME, Fournier E, Giraud T. 2007. Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evolution* **61**(1): 15-26.
- Le Guen V, Garcia D, Mattos CRR, Doare F, Lespinasse D, Seguin M. 2007. Bypassing of a polygenic Microcyclus ulei resistance in rubber tree, analyzed by QTL detection. New

Phytologist 173(2): 335-345.

- Lê Van A, Gladieux P, Lemaire C, Cornille A, Giraud T, Durel C-E, Caffier V, Le Cam B. 2012. Evolution of pathogenicity traits in the apple scab fungal pathogen in response to the domestication of its host. *Evolutionary Applications*: DOI: 10.1111/j.1752-4571.2012.00246.x.
- Leach JE, Cruz CMV, Bai JF, Leung H. 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 187-224.
- Lehman JS, Shaner G. 1997. Selection of populations of Puccinia recondita f. sp. tritici for shortened latent period on a partially resistant wheat cultivar. *Phytopathology* 87(2): 170-176.
- Leipe DD, Wainright PO, Gunderson JH, Porter D, Patterson DJ, Valois F, Himmerich S, Sogin ML. 1994. the stramenopiles from a molecular perspective 16s-like ribosomal-rna sequences from labyrinthuloides-minuta and cafeteria-roenbergensis. *Phycologia* 33(5): 369-377.
- Leonard KJ. 1997. Modelling gene frequency dynamics. In The Gene-for-Gene Relationship in Plant-Parasite Interactions eIC, EB Holub, JJ Burdon, pp. 211–30. London: CAB In 1997. Modelling gene frequency dynamics. *The Gene-for-Gene Relationship in Plant-Parasite Interactions, ed. IR Crute, EB Holub, JJ Burdon*. London: CAB, 211.
- Lepais, O., and C. F. E. Bacles. 2011. Comparison of random and SSR-enriched shotgun pyrosequencing for microsatellite discovery and single multiplex PCR optimization in Acacia harpophylla F. Muell. Ex Benth. Molecular Ecology Resources 11,711-724.
- Levesque CA, Brouwer H, Cano L, Hamilton JP, Holt C, Huitema E, Raffaele S, Robideau GP, Thines M, Win J, Zerillo MM, et al. 2010. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biology* 11(7).
- Links MG, Holub E, Jiang RHY, Sharpe AG, Hegedus D, Beynon E, Sillito D, Clarke WE, Uzuhashi S, Borhan MH. 2011. De novo sequence assembly of *Albugo candida* reveals a small genome relative to other biotrophic oomycetes. *Bmc Genomics* 12.
- Liu ZY, Bos JIB, Armstrong M, Whisson SC, da Cunha L, Torto-Alalibo T, Win J, Avrova AO, Wright F, Birch PRJ, Kamoun S. 2005. Patterns of diversifying selection in the phytotoxinlike scr74 gene family of *Phytophthora infestans*. *Molecular Biology and Evolution* 22(3): 659-672.
- Ma W, Guttman DS. 2008. Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Current Opinion in Plant Biology* 11(4): 412-419.
- Malausa, T., A. Gilles, E. Meglécz, H. Blanquart, S. Duthoy, C. Costedoat, V. Dubut, et al. 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. Molecular Ecology Resources 11: 638 – 644.
- Marcel TC, Gorguet B, Ta MT, Kohutova Z, Vels A, Niks RE. 2008. Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines. *New Phytologist* **177**(3): 743-755.
- Marguerit E, Boury C, Manicki A, Donnart M, Butterlin G, Nemorin A, Wiedemann-Merdinoglu S, Merdinoglu D, Ollat N, Decroocq S. 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* 118(7): 1261-1278.
- Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54: 23-61.
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganal MW, Spivey R, Wu TY, Earle ED, Tanksley SD. 1993. map-based cloning of a protein-kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262(5138): 1432-1436.
- Mayr E. 1942. Systematics and the Origin of Species. New York: Columbia University Press.
- McDonald BA, Linde C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349-+.
- McDonald JH, Kreitman M. 1991. Adaptive protein evolution at the adh locus in drosophila. *Nature* **351**(6328): 652-654.
- McDowell JM, Dhandaydham M, Long TA, Aarts MGM, Goff S, Holub EB, Dangl JL. 1998. Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of arabidopsis. *Plant Cell* **10**(11): 1861-1874.
- McGovern PE, Glusker DL, Exner LJ. 1996. Neolithic resinated wine. Nature 381: 480-481.

Meheut J, Griffe M. 1997. Le vin 50 siècles de passion: Le Cannet: C. L. c. d. M. Griffe, TSH.

Meglécz, E., C. Costedoat, V. Dubut, A. Gilles, T. Malausa, N. Pech, and J. F. Martin. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. Bioinformatics 26(3): 403-404.

- Meirmans PG, Van Tienderen PH. 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* 4(4): 792-794.
- Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Coste P, Dumas V, Haetty S, Butterlin G, Greif C 2003. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from Muscadinia rotundifolia. In: Hajdu E, Borbas E eds. *Proceedings of the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Vols 1 and 2*, 451-456.
- Millardet A. 1881. Notes sur les vignes américaines et opuscules divers sur le même sujet. Bordeaux: Féret & Fils.
- Mitchell MN, Ocamb CM, Grunwald NJ, Mancino LE, Gent DH. 2011. Genetic and Pathogenic Relatedness of *Pseudoperonospora cubensis* and *P-humuli*. *Phytopathology* **101**(7): 805-818.
- Montarry J, Corbiere R, Andrivon D. 2007. Is there a trade-off between aggressiveness and overwinter survival in *Phytophthora infestans? Functional Ecology* 21(3): 603-610.
- Montarry J, Corbiere R, Lesueur S, Glais I, Andrivon D. 2006. Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems? *Journal of Evolutionary Biology* **19**(2): 522-531.
- Montarry J, Glais I, Corbiere R, Andrivon D. 2008. Adaptation to the most abundant host genotype in an agricultural plant-pathogen system - potato late blight. *Journal of Evolutionary Biology* 21(5): 1397-1407.
- Montarry J, Hamelin FM, Glais I, Corbi R, Andrivon D. 2010. Fitness costs associated with unnecessary virulence factors and life history traits: evolutionary insights from the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Bmc Evolutionary Biology* **10**.
- Moreira FM, Madini A, Marino R, Zulini L, Stefanini M, Velasco R, Kozma P, Grando MS. 2011. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (Vitis spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genetics & Genomes* **7**(1): 153-167.
- Mundt CC. 2002. Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. Annual Review of Phytopathology 40: 381-+.
- Myles S, Boyko AR, Owens CL, Brown PJ, Grassi F, Aradhya MK, Prins B, Reynolds A, Chia J-M, Ware D, Bustamante CD, Buckler ES. 2011. Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(9): 3530-3535.
- Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press.
- O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Casper HH. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of Fusarium graminearum, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(14): 7905-7910.
- Palloix A, Ayme V, Moury B. 2009. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist* 183(1): 190-199.
- Pariaud B, Ravigne V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* **58**(3): 409-424.
- Pariaud B, Robert C, Goyeau H, Lannou C. 2009. Aggressiveness Components and Adaptation to a Host Cultivar in Wheat Leaf Rust. *Phytopathology* **99**(7): 869-878.
- Parker JE, Coleman MJ, Szabo V, Frost LN, Schmidt R, vanderBiezen EA, Moores T, Dean C, Daniels MJ, Jones JDG. 1997. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with N and L6. *Plant Cell* 9(6): 879-894.
- Parlevliet JE. 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* **124**(2): 147-156.
- Peressotti E, Duchene E, Merdinoglu D, Mestre P. 2011. A semi-automatic non-destructive method to quantify grapevine downy mildew sporulation. *Journal of Microbiological Methods* 84(2): 265-271.
- Peressotti E, Wiedemann-Merdinoglu S, Delmotte F, Bellin D, Di Gaspero G, Testolin R, Merdinoglu D, Mestre P. 2010. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *Bmc Plant Biology* **10**.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8(10): 785-786.
- Ploch S, Choi YJ, Rost C, Shin HD, Schilling E, Thines M. 2010. Evolution of diversity in Albugo is driven by high host specificity and multiple speciation events on closely related Brassicaceae.

Molecular Phylogenetics and Evolution 57(2): 812-820.

- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ. 2009. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science* 14(1): 21-29.
- Ponchet M, Panabieres F, Milat ML, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y, Blein JP. 1999. Are elicitins cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cellular and Molecular Life Sciences* 56(11-12): 1020-1047.
- Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9): 817-818.
- **Poulin R. 1995.** Clutch size and egg size in free-living and parasitic copepods: a comparative analysis. *Evolution* **49**(2): 325-336.
- Pringle A, Baker DM, Platt JL, Wares JP, Latge JP, Taylor JW. 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus Aspergillus fumigatus. *Evolution* **59**(9): 1886-1899.
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. 2000. Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics* 67(1): 170-181.
- Prugnolle F, McGee K, Keebler J, Awadalla P. 2008. Selection shapes malaria genomes and drives divergence between pathogens infecting hominids versus rodents. *Bmc Evolutionary Biology* 8.
- Qutob D, Kemmerling B, Brunner F, Kuefner I, Engelhardt S, Gust AA, Luberacki B, Seitz HU, Stahl D, Rauhut T, Glawischnig E, Schween G, Lacombe B, Watanabe N, Lam E, Schlichting R, Scheel D, Nau K, Dodt G, Hubert D, Gijzen M, Nuernberger T. 2006. Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell* **18**(12): 3721-3744.
- Qutob D, Tedman-Jones J, Dong S, Kuflu K, Pham H, Wang Y, Dou D, Kale SD, Arredondo FD, Tyler BM, Gijzen M. 2009. Copy Number Variation and Transcriptional Polymorphisms of Phytophthora sojae RXLR Effector Genes Avr1a and Avr3a. *Plos One* **4**(4).
- Raffaele S, Farrer RA, Cano LM, Studholme DJ, MacLean D, Thines M, Jiang RHY, Zody MC, Kunjeti SG, Donofrio NM, Meyers BC, Nusbaum C, Kamoun S. 2010. Genome Evolution Following Host Jumps in the Irish Potato Famine Pathogen Lineage. *Science* **330**(6010): 1540-1543.
- Rambaut A, Drummond A 2007. Tracer v1.4, Available from http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer.
- Rauscher G, Simko I, Mayton H, Bonierbale M, Smart CD, Gruenwald NJ, Greenland A, Fry WE. 2010. Quantitative resistance to late blight from *Solanum berthaultii* cosegregates with RPiber: insights in stability through isolates and environment. *Theoretical and Applied Genetics* 121(8): 1553-1567.
- Refregier G, Le Gac M, Jabbour F, Widmer A, Shykoff JA, Yockteng R, Hood ME, Giraud T. 2008. Cophylogeny of the anther smut fungi and their caryophyllaceous hosts: Prevalence of host shifts and importance of delimiting parasite species for inferring cospeciation. *Bmc Evolutionary Biology* 8.
- Rehmany AP, Gordon A, Rose LE, Allen RL, Armstrong MR, Whisson SC, Kamoun S, Tyler BM, Birch PRJ, Beynon JL. 2005. Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two Arabidopsis lines. *Plant Cell* 17(6): 1839-1850.
- Roof D. 2002. Life history evolution. Riverside, California: University of California.
- Rose JKC, Ham KS, Darvill AG, Albersheim P. 2002. Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: Coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell* **14**(6): 1329-1345.
- Rouxel M, Mestre P, Comont G, Lehman BL, Schilder A, Delmotte F. 2012b. Phylogenetic and experimental evidence for host-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete. *New Phytologist* in press.
- Rouxel M, Papura D, Nogueira M, Machefer V, Dezette D, Richard-Cervera S, Carrere S, Mestre P, Delmotte F. 2012a. Microsatellite markers for characterization of native and introduced populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(17): 6337-6340.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**(18): 2496-2497.
- **Runge F, Thines M. 2012.** Reevaluation of Host Specificity of the Closely Related Species Pseudoperonospora humuli and P. cubensis. *Plant Disease* **96**(1): 55-61.

- Sandhu D, Schallock KG, Rivera-Velez N, Lundeen P, Cianzio S, Bhattacharyya MK. 2005. Soybean Phytophthora resistance gene Rps8 maps closely to the Rps3 region. *Journal of Heredity* **96**(5): 536-541.
- Sapoukhina N, Durel C-E, Le Cam B. 2009. Spatial deployment of gene-for-gene resistance governs evolution and spread of pathogen populations. *Theoretical Ecology* 2(4): 229-238.
- Savulescu T, Savulescu O. 1951. Studiul morfologic, biologic si sistematic al genurilor Sclerospora, Basidiophora, Plasmopara si Peronoplasmopara. *Bulletin Scientifique, Section des Sciences Biologiques, Agronomiques, Géologiques et Géographiques* III(3): 400-409.
- Scherer E, Gisi U. 2006. Characterization of genotype and mating type in European isolates of Plasmopara viticola. *Journal of Phytopathology* **154**(7-8): 489-495.
- Schornack S, van Damme M, Bozkurt TO, Cano LM, Smoker M, Thines M, Gaulin E, Kamoun S, Huitema E. 2010. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(40): 17421-17426.
- Schroder S, Telle S, Nick P, Thines M. 2011. Cryptic diversity of *Plasmopara viticola* (Oomycota, Peronosporaceae) in North America. *Organisms Diversity & Evolution* **11**(1): 3-7.
- Schulze-Lefert P, Panstruga R. 2011. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends in Plant Science* 16(3): 117-125.
- Schwander F, Eibach R, Fechter I, Hausmann L, Zyprian E, Toepfer R. 2012. Rpv10: a new locus from the Asian Vitis gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* **124**(1): 163-176.
- Servedio MR, Van Doorn GS, Kopp M, Frame AM, Nosil P. 2011. Magic traits in speciation: 'magic' but not rare? *Trends in Ecology & Evolution* 26(8): 389-397.
- Shan WX, Cao M, Dan LU, Tyler BM. 2004. The Avr1b locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene Rps1b. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(4): 394-403.
- Sicard D, Pennings PS, Grandclement C, Acosta J, Kaltz O, Shykoff JA. 2007. Specialization and local adaptation of a fungal parasite on two host plant species as revealed by two fitness traits. *Evolution* **61**(1): 27-41.
- Smith CC, Fretwell SD. 1974. The optimal balance between size and number of offspring. *American Naturalist* 108: 499-506.
- Song JQ, Bradeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus SM, Haberlach GT, Liu J, Kuang HH, Austin-Phillips S, Buell CR, Helgeson JP, Jiang JM. 2003. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(16): 9128-9133.
- Spielmeyer W, McIntosh RA, Kolmer J, Lagudah ES. 2005. Powdery mildew resistance and Lr34/Yr18 genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **111**(4): 731-735.
- **St Clair DA 2010.** Quantitative Disease Resistance and Quantitative Resistance Loci in Breeding. In: VanAlfen NKBGLJE ed. *Annual Review of Phytopathology, Vol 48*, 247-268.
- Staudt G, Kassemeyer HH. 1995. Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild Vitis species. *Vitis* 34(4): 225-228.
- Stearns SC. 1992. The evolution of life histories. London: Oxford University Press.
- Steenkamp ET, Wingfield BD, Desjardins AE, Marasas WFO, Wingfield MJ. 2002. Cryptic speciation in *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* **94**(6): 1032-1043.
- Stergiopoulos I, De Kock MJD, Lindhout P, De Wit PJGM. 2007. Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**(10): 1271-1283.
- Stukenbrock EH, Bataillon T. 2012. A population genomics perspective on the emergence and adaptation of new plant pathogens in agro-ecosystems. *PLoS pathogens* 8(9): e1002893-e1002893.
- Stukenbrock EH, Bataillon T, Dutheil JY, Hansen TT, Li RQ, Zala M, McDonald BA, Wang J, Schierup MH. 2011. The making of a new pathogen: Insights from comparative population genomics of the domesticated wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* and its wild sister species. *Genome Research* 21(12): 2157-2166.
- Stukenbrock EH, McDonald BA. 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 75-100.

- Swofford DL. 1993. Paup a Computer-Program for Phylogenetic Inference Using Maximum Parsimony. *Journal of General Physiology* 102(6): A9-A9.
- **Tajima F. 1983.** Evolutionary relationship of DNA-sequences in finite populations. *Genetics* **105**(2): 437-460.
- **Talas F, Kalih R, Miedaner T. 2012.** Within-Field Variation of *Fusarium graminearum* Isolates for Aggressiveness and Deoxynivalenol Production in Wheat Head Blight. *Phytopathology* **102**(1): 128-134.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Tan MYA, Hutten RCB, Celis C, Park T-H, Niks RE, Visser RGF, van Eck HJ. 2008. The R(Pimcd1) locus from Solanum microdontum involved in resistance to *Phytophthora infestans*, causing a delay in infection, maps on potato chromosome 4 in a cluster of NBS-LRR genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**(7): 909-918.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **31**(1): 21-32.
- Telle S, Shivas RG, Ryley MJ, Thines M. 2011. Molecular phylogenetic analysis of *Peronosclerospora* (Oomycetes) reveals cryptic species and genetically distinct species parasitic to maize. *European Journal of Plant Pathology* **130**(4): 521-528.
- Tellier A, De Vienne DM, Giraud T, Hood ME, Refrégier G 2010. Theory and examples of reciprocal influence between hosts and pathogens, from short-term to long term interactions: coevolution, cospeciation and pathogen speciation following host shifts. *Host-Pathogen Interactions: Genetics, Immunology and Physiology*. NY, USA: Nova Science Publishers.
- Thines M, Runge F, Telle S, VogImayr H. 2010. Phylogenetic investigations in the downy mildew genus Bremia reveal several distinct lineages and a species with a presumably exceptional wide host range. *European Journal of Plant Pathology* **128**(1): 81-89.
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S, Olivier JM. 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*(7): 75-83.
- Thomma BPHJ, Nuernberger T, Joosten MHAJ. 2011. Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *Plant Cell* 23(1): 4-15.
- **Thompson JN. 1999.** Coevolution and escalation: Are ongoing coevolutionary meanderings important? *American Naturalist* **153**: S92-S93.
- Thrall PH, Burdon JJ. 2003. Evolution of virulence in a plant host-pathogen metapopulation. *Science* 299(5613): 1735-1737.
- Tian M, Win J, Savory E, Burkhardt A, Held M, Brandizzi F, Day B. 2011. 454 Genome Sequencing of *Pseudoperonospora cubensis* Reveals Effector Proteins with a QXLR Translocation Motif. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(5): 543-553.
- Tian MY, Huitema E, da Cunha L, Torto-Alalibo T, Kamoun S. 2004. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *Journal of Biological Chemistry* **279**(25): 26370-26377.
- Torto TA, Li SA, Styer A, Huitema E, Testa A, Gow NAR, van West P, Kamoun S. 2003. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora. Genome Research* **13**(7): 1675-1685.
- Tyler BM. 2002. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 137-167.
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RHY, Aerts A, Arredondo FD, Baxter L, Bensasson D, Beynon JL, et al. 2006. Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**(5791): 1261-1266.

Van der Plank JE. 1968. Disease Resistance in Plants. New York, USA: Academic Press.

- van der Vossen E, Sikkema A, Hekkert BtL, Gros J, Stevens P, Muskens M, Wouters D, Pereira A, Stiekema W, Allefs S. 2003. An ancient R gene from the wild potato species Solanum bulbocastanum confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant Journal* 36(6): 867-882.
- van der Vossen EAG, Gros J, Sikkema A, Muskens M, Wouters D, Wolters P, Pereira A, Allefs
   S. 2005. The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant Journal* 44(2): 208-222.

van Poppel PMJA, Guo J, de Vondervoort PJIv, Jung MWM, Birch PRJ, Whisson SC, Govers F.

**2008.** The *Phytophthora infestans* Avirulence Gene Avr4 Encodes an RXLR- dEER Effector. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**(11): 1460-1470.

- Vera Cruz CM, Bai J, Ona I, Leung H, Nelson RJ, Mew TW, Leach JE. 2000. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25): 13500-13505.
- Viennot-Bourgin G. 1949. Les champignons parasites des plantes cultivées. Paris, France: Masson & Cie, Librairies de l'Académie de Médecine.
- Vleeshouwers VGAA, Raffaele S, Vossen JH, Champouret N, Oliva R, Segretin ME, Rietman H, Cano LM, Lokossou A, Kessel G, Pel MA, Kamoun S 2011. Understanding and Exploiting Late Blight Resistance in the Age of Effectors. In: VanAlfen NKBGLJE ed. *Annual Review of Phytopathology, Vol 49*, 507-531.
- Vleeshouwers VGAA, Rietman H, Krenek P, Champouret N, Young C, Oh S-K, Wang M, Bouwmeester K, Vosman B, Visser RGF, Jacobsen E, Govers F, Kamoun S, Van der Vossen EAG. 2008. Effector Genomics Accelerates Discovery and Functional Profiling of Potato Disease Resistance and *Phytophthora Infestans* Avirulence Genes. *Plos One* 3(8).
- Wang Q, Han C, Ferreira AO, Yu X, Ye W, Tripathy S, Kale SD, Gu B, Sheng Y, Sui Y, Wang X, Zhang Z, Cheng B, Dong S, Shan W, Zheng X, Dou D, Tyler BM, Wang Y. 2011. Transcriptional Programming and Functional Interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR Effector Repertoire. *Plant Cell* 23(6): 2064-2086.
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, van West P, Chapman S, Hein I, Toth IK, Pritchard L, Birch PRJ. 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**(7166): 115-+.
- Win J, Morgan W, Bos J, Krasileva KV, Cano LM, Chaparro-Garcia A, Ammar R, Staskawicz BJ, Kamoun S. 2007. Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Plant Cell* **19**(8): 2349-2369.
- Win J, Krasileva KV, Kamoun S, Shirasu K, Staskawicz BJ, Banfield MJ. 2012. Sequence divergent RXLR effectors share a structural fold conserved across plant pathogenic oomycete species. *PLoS pathogens* 8(1): e1002400.
- Wong FP, Burr HN, Wilcox WF. 2001. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* **50**(4): 427-432.
- Yoshida K, Saitoh H, Fujisawa S, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Tosa Y, Chuma I, Takano Y, Win J, Kamoun S, Terauchi R. 2009. Association Genetics Reveals Three Novel Avirulence Genes from the Rice Blast Fungal Pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 21(5): 1573-1591.
- Young ND. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 34: 479-501.
- Zaffarano PL, McDonald BA, Linde CC. 2008. Rapid speciation following recent host shifts in the plant pathogenic fungus *Rhynchosporium*. *Evolution* **62**(6): 1418-1436.
- Zecca G, Abbott JR, Sun WB, Spada A, Sala F, Grassi F. 2012. The timing and the mode of evolution of wild grapes (Vitis). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62(2): 736-747.
- Zhu YY, Chen HR, Fan JH, Wang YY, Li Y, Chen JB, Fan JX, Yang SS, Hu LP, Leung H, Mew TW, Teng PS, Wang ZH, Mundt CC. 2000. Genetic diversity and disease control in rice. *Nature* 406(6797): 718-722.



### **ANNEXE 1**

Mélanie Rouxel, Pere Mestre, Gwenaëlle Comont, Brian L. Lehman, Annemiek Schilder, François Delmotte. 2012. Phylogenetic and experimental evidence for hot-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete. New Phytologist. In press.



# Phylogenetic and experimental evidence for host-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete

## Mélanie Rouxel<sup>1,2</sup>, Pere Mestre<sup>3,4</sup>, Gwenaelle Comont<sup>1,2</sup>, Brian L. Lehman<sup>5</sup>, Annemiek Schilder<sup>5\*</sup> and François Delmotte<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, F-33883, Villenave d'Ornon, France; <sup>2</sup>Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, F-33883, Villenave d'Ornon, France; <sup>3</sup>INRA, UMR1131 Santé de la Vigne et Qualité du vin, F-68000, Colmar, France; <sup>4</sup>Université de Strasbourg, UMR1131 Santé de la Vigne et Qualité du vin, F-68000, Colmar, France; <sup>5</sup>Department of Plant Pathology, Michigan State University, East Lansing, MI, 48824, USA

Author for correspondence: François Delmotte Tel: +33 5 57 12 26 42 Email: delmotte@bordeaux.inra.fr

Received: *3 September 2012* Accepted: *22 September 2012* 

*New Phytologist* (2012) **doi**: 10.1111/nph.12016

Key words: disease emergence, evolution of aggressiveness in agro-ecosystem, host plant specialization, host shift, plant–pathogen interaction, *Plasmopara viticola* (the causal agent of grapevine downy mildew), quantitative adaptation to cultivar, *Vitis vinifera* and wild relatives.

#### **Summary**

• Assortative mating resulting from host plant specialization has been proposed to facilitate rapid ecological divergence in biotrophic plant pathogens. Downy mildews, a major group of biotrophic oomycetes, are prime candidates for testing speciation by host plant specialization.

• Here, we combined a phylogenetic and morphological approach with cross-pathogenicity tests to investigate host plant specialization and host range expansion in grapevine downy mildew. This destructive disease is caused by *Plasmopara viticola*, an oomycete endemic to North America on wild species and cultivated grapevines.

• Multiple genealogies and sporangia morphology provide evidence that *P. viticola* is a complex of four cryptic species, each associated with different host plants. Cross-inoculation experiments showed complete host plant specialization on *Parthenocissus quinquefolia* and on *Vitis riparia*, whereas cryptic species found on *V. aestivalis*, *V. labrusca* and *V. vinifera* were revealed to be less specific. We reconstructed the recent host range expansion of *P. viticola* from wild to cultivated grapevines, and showed that it was accompanied by an increase in aggressiveness of the pathogen.

• This case study on grapevine downy mildew illustrates how biotrophic plant pathogens can diversify by host plant specialization and emerge in agrosystems by shifting to cultivated hosts. These results might have important implications for viticulture, including breeding for resistance and disease management.

#### Introduction

Host shift speciation has been shown to be responsible for the diversification of plant parasites (Refregier et al., 2008; Tellier et al., 2009). Host plants and their parasites exhibit intimate physiological interactions, which lead to the evolution of hostspecific adaptations following host shifts. Certain life history traits and specificities in the life cycles of plant pathogens may facilitate rapid ecological divergence by reducing the constraints that usually impair speciation. Indeed, the production of numerous propagules, the linkage of traits experiencing selection, together with the strong selection imposed by the hosts and the gene exchange occurring within hosts, are key factors that strongly favor ecological speciation (Giraud et al., 2010). Withinhost mating and selection are especially important in biotrophic plant pathogens that strictly depend on the plant to survive and that undergo sexual reproduction on the host plant. In this case, mutations providing adaptation to a new host pleiotropically affect mating patterns, providing one of the most favorable scenarios for ecological speciation (Gavrilets, 2004). The rapid ecological divergence experienced by plant pathogens implies that many may, in fact, be complexes of sibling species, an idea put forward by Crous & Groenewald (2005): 'Show me a plant pathogen, and I will show you a species complex'. Since then, there has been abundant phylogenetic evidence supporting the view that many current names of well-known plant pathogens actually mask complexes of cryptic species (O'Donnell et al., 2000; Steenkamp et al., 2002; Fournier et al., 2005; Le Gac et al., 2007; Garcia-Blazquez et al., 2008; Choi et al., 2011). In addition to the divergent selective pressures caused by specialization on the host, plant pathogens have evolved in response to the agroecosystem. Cultivated crops indeed represent large naïve targets for pathogens shifting from wild hosts. Genetic and environmental uniformity, coupled with vast plantations of cultivated plants, are expected to favor more aggressive pathogens (Anderson & May, 1982; Stukenbrock & McDonald, 2008). Confirming this hypothesis, evidence for an increase in aggressiveness resulting from domestication has been documented for the main

<sup>\*</sup>These authors contributed equally to this work.

pathogens of rice (Couch *et al.*, 2005), apple (Lê Van *et al.*, 2012) and wheat (Stukenbrock *et al.*, 2011).

The pathosystem Vitis-Plasmopara viticola is a prime candidate for the study of host specialization in biotrophic plant pathogens. The modern grapevine originated from the domestication of a unique Eurasian species (V. vinifera L.; Zecca et al., 2012). It has been cultivated since ancient times, with the earliest evidence for winemaking dating back to 7400-7000 BP in the Caucasian area (McGovern et al., 1996). The history of viticulture parallels the development of western civilizations, and its cultural significance persists today in centuries-old viticultural countries. From the middle of the 19th century, viticulture has been threatened by grapevine downy mildew, a disease that was introduced into Europe from northern America (Millardet, 1881). Grapevine downy mildew, caused by the obligate biotrophic oomycete P. viticola, is considered to be one of the most destructive grapevine diseases worldwide (Viennot-Bourgin, 1949). Grapevine (V. vinifera) cultivars are highly susceptible to the disease and currently require an intense chemical management programme to control the disease. In northeastern America, the native range of *P. viticola*, the Vitaceae family presents a higher diversity than in Europe. Therefore, P. viticola has been described on several Vitis species in the Vitaceae: in addition to V. vinifera, it has been found on other cultivated grapes (e.g. Vitis labrusca L. (fox grape)), as well as on wild grapes, such as V. riparia Michx. (river bank grape) and V. aestivalis Michx. Virginia creeper (Parthenocissus (summer grape), and quinquefolia L. Planch; Bush & Meissner, 1883).

Several studies have addressed the question of host plant specialization in the interaction between *P. viticola* and the Vitaceae. First, several decades ago, Savulescu & Savulescu (1951) and Golovina (1955) independently proposed the existence of different specialized forms of P. viticola on the Vitaceae based on the morphology of spores; however, as for many plant pathogens, morphological characteristics alone are too variable and/or simple to allow clear species delineation, and these specialized forms of the pathogen could never be further confirmed. Second, a comparison of disease resistance screens of Vitis germplasm performed in different laboratories with different isolates showed a lack of concordance between the different studies (Cadle-Davidson, 2008); this observation could, in part, be explained by the occurrence of race-specific isolates in *P. viticola*, in particular for resistant cultivars and advanced breeding lines. Third, the genetic analysis of 14 P. viticola isolates, including nine North American isolates, led Schröder et al. (2011) to propose the existence of several genetic lineages in grapevine downy mildew; however, because of the limited sampling of this study, the results were not conclusive on the status of the lineages described, thus making it difficult to assess the association between the pathogens and their host plants. A more comprehensive study is therefore required to address the existence of specialized cryptic species in grapevine downy mildew.

Different criteria have been employed to recognize species: typological, which emphasize morphological divergence; biological (Mayr, 1942), which emphasize reproductive isolation; and phylogenetic, based on genetic divergence. As a result of the

biotrophic nature of *P. viticola*, crossing strains of this pathogen and obtaining viable progenies are very challenging, as they require cumbersome and time-consuming bioassays (Scherer & Gisi, 2006; Gisi et al., 2007). This clearly impedes the use of biological procedures for the recognition of species in grapevine downy mildew. Taylor et al. (2000) advocated the use of the analysis of multiple genes as a criterion to identify phylogenetic species within fungal pathogens, and introduced the term 'genealogical concordance phylogenetic species recognition' (GCPSR). GCPSR uses the phylogenetic concordance of multiple unlinked genes to indicate a lack of genetic exchanges, and thus the evolutionary independence of lineages. This approach has proved to be the most convenient for fungal species delimitation, because it is more finely discriminating than the other criteria, and also because it is applicable to fungal species that cannot be cultivated or mate in control conditions (O'Donnell et al., 2000; Steenkamp et al., 2002; Pringle et al., 2005; Le Gac et al., 2007; Giraud et al., 2008; Henk et al., 2011).

In the present study, we have addressed the existence of host plant-specialized species in grapevine downy mildew by combining a phylogenetic approach based on the concordance of multiple genealogies, analyses on sporangia morphology and controlled cross-inoculation experiments. We collected downy mildew samples on three wild species (P. quinquefolia, V. riparia, V. aestivalis) and several cultivated varieties (V. labrusca cv Niagara and Concord, V. vinifera, interspecific hybrids) in the states of Michigan, Ohio, New York and Virginia (USA). We analyzed the polymorphism at four different nuclear loci (actin, tubulin, internal transcribed spacer and nrLSU) of these isolates, and assessed their pathogenicity and aggressiveness by cross-inoculating a subset of isolates on six host plants. This allowed us to address the following specific questions. Are there genetically isolated lineages within P. viticola that have not been distinguished on the basis of morphological criteria? What is the level of morphological divergence among P. viticola collected on different hosts? Are P. viticola isolates able to infect a single host species or a broad range of Vitis spp.? Has the expansion from wild to cultivated hosts modified the life history traits of the pathogen (pathogenicity, aggressiveness)?

#### **Materials and Methods**

#### Background

*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni, is a heterothallic diploid oomycete (Oomycota, Stramenopiles) that undergoes several asexual generations during the grape growing season and one sexual cycle in autumn. In spring, oospores resulting from sexual reproduction germinate and release zoospores that give rise to primary infections. Under favorable weather conditions, asexual reproduction leads to secondary infection through the production of sporangia containing zoospores that spread to the leaves and berries by splashing rain or wind. In this study, each sample of *P. viticola* collected from the field consisted of  $1 \text{ cm}^2$  of a fresh leaf colonized by sporulating downy mildew.

#### Plant material

Six host plants were used for the inoculation experiments: *V. vinifera* cv Chardonnay (Double A vineyard nursery, Fredonia, NY, USA), *V. riparia* Michx. (Cold Stream Farm nursery, Free Soil, MI, USA), *P. quinquefolia* L. Planch. (growing wild in Lansing, MI, USA), *V. aestivalis* (accession REM59-77; USDA-ARS Plant Genetic Resources Unit, Geneva, NY, USA), *V. labrusca* cv Niagara (Double A vineyard nursery) and Chancellor (Seibel 7053; Double A vineyard nursery). Plants were grown in a growth chamber at 25°C, with a 16 h : 8 h light : dark photoperiod.

#### Plasmopara viticola sampling and collection

Downy mildew isolates were collected from naturally infected cultivated and wild grapes (*V. labrusca, V. vinifera, V. riparia, V. aestivalis, Vitis* interspecific hybrids), as well as from virginia creeper (*P. quinquefolia*) in Michigan, Ohio, New York and Virginia.

**Isolates for phylogenetic study** Downy mildew samples were collected from geographically separated locations for a given host plant. A total of 114 isolates was sampled in 18 locations on three wild species (*P. quinquefolia, V. riparia, V. aestivalis*) and cultivated varieties (*V. labrusca, V. vinifera,* hybrids; Fig. 1, Supporting Information Table S1).

Live isolates A collection of live isolates derived from natural infection of *P. viticola* was established. A first set of live isolates consisted of four bulk samples created by pooling the spores of several sporulating lesions collected in different locations, but on the same host plant. These bulk samples were made from isolates collected on *V. vinifera* (bulkVIN), *V. labrusca* (bulkLAB), *V. riparia* (bulkRIP) and *P. quinquefolia* (bulkPAR). In addition, 19 isolates were established from individual infected leaves from *V. aestivalis* (n=2), *V. vinifera* (n=5), *V. labrusca* (n=4), *V. riparia* (n=4) and Chancellor (n=4) collected at different locations (Fig. 1, Table S2). All the isolates were genetically characterized using the four nuclear markers described in the Genetic characterization section.

#### Genetic characterization and phylogenetic analysis

**DNA extraction** Oil spots were freeze–dried overnight, and DNA was extracted from each according to the standard cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB) and phenol–chloroform methods described in Delmotte *et al.* (2006) and Chen *et al.* (2007).

DNA amplification and sequencing Four different gene regions were selected for molecular characterization. Specific primers were designed for the internal transcribed spacer region 1 (ITS), a fragment of the 28S gene of the ribosomal RNA (28S), a fragment of the gene encoding  $\beta$ -tubulin (TUB) and a fragment



Fig. 1 Geographical origin and source host plants of *Plasmopara viticola* isolates. A detailed description of the samples is presented in Supporting Information Tables S1 and S2.

of the actin gene (ACT) (Table S3). PCRs were carried out in a final volume of 15  $\mu$ l containing 1  $\mu$ l of 1 : 3 dilution of genomic DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 150  $\mu$ M of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 4 pmol of each primer and 0.3 U T*aq* Silverstar DNA polymerase in reaction buffer. Thermocycling conditions were as follows: 95°C for 4 min, 40 cycles of 95°C for 40 s, 58°C for 45 s, 72°C for 90 s, followed by 72°C for 10 min. Sequencing of PCR amplicons was outsourced at Genoscope, the French National Sequencing Center (Evry, France).

Sequence assembly and allele inference Forward and reverse sequences were imported into CodonCode Aligner (v. 2.0.6; Codon Code Corporation, Centerville, MA, USA), assembled into contigs and visually checked for errors. All the polymorphic sites were confirmed by manual examination of the electropherogram. For sequences that presented heterozygote sites, gametic phase estimation was performed using the ELB algorithm implemented into Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Using this method, we have determined for each isolate the two alleles at each of the four loci (Table S1). Aligned sequences for each gene region and for the concatenated dataset were analyzed in DnaSP v. 4.00.6 (Rozas *et al.*, 2003) for nucleotide polymorphisms.

The sequences of the alleles obtained have been deposited in GenBank: ITS hap1–4 (JF897779–JF897782), 28S hap1–8 (JF897848–JF897855),  $\beta$ -tubulin hap1–32 (JF897846–JF897847), actin hap1–32 (JF897783–JF897815).

Phylogenetic analyses Data from each genomic region were first analyzed alone, and then all regions were combined in a single analysis (concatenated dataset). The different sets of alleles were aligned using Muscle implemented in Seaview (Gouy et al., 2010). Phylogenetic relationships among alleles (and individual samples) were inferred using maximum likelihood (ML) methods implemented in PhyML (Guindon & Gascuel, 2003) and maximum parsimony (MP) implemented in PAUP (Swofford, 1993). MP genealogies were constructed using the heuristic search function with 1000 random addition replicates and tree bisection and reconstruction (TBR) using a branch swapping algorithm. Gaps were treated as fifth characters and all characters were unordered and of equal weight. Insertions/deletions (indels), irrespective of their size, were each treated as one evolutionary event and weighted as one base substitution. To estimate branch support, bootstrap values were determined using 1000 bootstrap replicates for MP and ML.

The best-fit models of nucleotide substitution were selected using MODELTEST v. 3.06 (Posada & Crandall, 1998) based on likelihood scores for 88 different models and the Akaike information criterion (AIC). *Phytophthora sojae* was used as an outgroup for the phylogenetic analyses.

**Species tree analyses** A species tree inference approach was used to resolve the relationship among the lineages identified. We estimated the species tree of *P. viticola* using Bayesian methods under the \*BEAST v1.7.3 software package (Drummond *et al.*, 2012). A single tree was reconstructed from the four independent loci (ITS, 28S, ACT, TUB), implementing the recommended

substitution models for each locus as obtained from MODEL-TEST. All samples with sequence data for every locus were used. A Yule speciation process was specified as it is the most appropriate when comparing relationships between species. We ran Monte Carlo Markov chains (MCMCs) for 10 million generations, sampling trees every 1000 generations and using a strict molecular clock. We used Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond, 2007) to assess likelihood stabilization and convergence for BEAST analyses, and discarded the first 10% of trees as burn-in.

**Polymorphism, recombination, differentiation** For each lineage, standard population genetic analyses were performed on samples presenting distinct genotypes (combination of alleles) at a given location. This was performed to avoid a misleading interpretation resulting from the clonal amplification of isolates that can occur in one geographical site (field). We calculated the number of segregating sites, the number of alleles, haplotypic diversity and  $\pi$ , the average number of nucleotide differences between pairs of sequences (Nei, 1987), the number of parsimony informative sites and Tajima's D using the program DnaSP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003). Divergence among lineages was estimated in DnaSP as the average pairwise number of nucleotide differences per site,  $D_{xy}$  (Tajima, 1983). Differentiation between lineages was also tested using the  $K_{ST}^*$  statistic (Hudson *et al.*, 1992).

#### Cross-inoculation experiments

For each Vitis spp., the fourth and fifth youngest leaves from growing shoots were collected, rinsed with sterile water and dried. Leaf disks were excised, bulked and distributed abaxial face up over Petri dishes covered by wet filter paper. Inoculum of downy mildew isolates was prepared as follows: infected leaves from the field were rinsed with water and placed in a growth chamber overnight in order to obtain new sporulation; sporangia on the surface were collected, resuspended in sterile water and kept in ice. The sporangia concentration of each sample was measured using a hemocytometer, and inocula were diluted to obtain a final concentration of  $20\,000$  spores ml<sup>-1</sup>. Inoculations were performed by placing a 20-µl drop of inoculum on the center of the abaxial face of each leaf disk, that is c. 400 spores per drop. After incubation overnight in the dark at 21°C, leaf drops were dried. Petri dishes were sealed and incubated at 21°C, with a 16 h : 8 h light : dark photoperiod.

In a first experiment, the four bulk samples of isolates (bulk-VIN, bulkLAB, bulkRIP, bulkPAR) were inoculated on *V. vinifera* (cv Chardonnay), *V. labrusca* (cv Niagara), *V. riparia* and *P. quinquefolia*, leading to 16 host–pathogen interactions. Each interaction consisted of 21 leaf disks distributed in three circular 90-mm Petri dishes.

In a second experiment, 19 isolates collected on five source hosts (*V. vinifera, V. labrusca, V. riparia, V. aestivalis* and Chancellor) were inoculated on the same five host plants. A total of 95 host–pathogen interactions, each replicated seven times, was assessed. This consisted of 665 leaf disks placed in seven 23-cm square dishes, each including the 95 combinations of the experiment. For both experiments, leaf disks were observed from 3 to 7 d post-inoculation (dpi) and scored for the presence of sporulation and necrosis (hypersensitive reaction of the plant). For the second experiment, sporulation of each leaf disk was quantified using the Scepter 2.0TM automated cell counter (Millipore). The cell size range used for counting sporangia was 8–25  $\mu$ m.

Quantitative data were analyzed by nonparametric analysis of variance (Kruskal–Wallis test) followed by *post hoc* pairwise Wilcoxon tests for comparisons among isolates grouped by lineages and source host plant. Isolates coming from the same source host plant and belonging to the same lineage were considered as a random effect in the analysis. Therefore, data from these isolates were pooled, resulting in six groups of isolates: CHA (lineage A), RIP (lineage A), AES (lineage B), LAB (lineage B), VIN (lineage B), VIN (lineage C). Statistical tests were conducted in R (http://www.r-project.org/).

#### Morphological diversity

Sporangia size was assessed directly from natural infection collected in the field, as well as from infection resulting from crossinoculations. For field samples, 40 samples were chosen among the isolates collected for the phylogenetic study. Plant tissue samples were stored in a fixative solution until analysis. Ten sporangia per isolate were measured under the microscope using a stage micrometer. For samples derived from the controlled inoculation, we assessed the morphology of sporangia from each leaf disk that exhibited sporulation. The size of sporangia was measured using the automated cell counter as described in the Crossinoculation experiments section. Data were analyzed using a nonparametric analysis of variance implemented in R software.

#### Results

#### Phylogenetic analysis

Sequences were obtained from 112 *P. viticola* isolates for ITS, 113 for 28S, 107 for ACT and 103 for TUB (Table S1). All isolates for which a sequence was obtained were revealed to be homozygous for ITS, whereas, for ACT, TUB and 28S, heterozygous sites were detected. Gametic phase estimation was performed for these three gene regions, and the two alleles present at each locus were reconstructed for each sample (Table S1).

We obtained four alleles for ITS (ITS1–ITS4), nine for 28S (LS1–LS9), 33 for ACT (ACT1–ACT33) and 33 for TUB (TUB1–TUB33). For coding regions (ACT, TUB), all variable sites identified resulted from synonymous substitutions. A summary of the polymorphism and diversity of each gene region is presented in Table 1. Globally, the most polymorphic gene region was TUB ( $\pi$ =0.053907) and the least polymorphic was 28S ( $\pi$ =0.010547). Four indels of one nucleotide were found to be located in ITS (n=3) and 28S (n=1). The numbers of parsimony informative sites (excluding gaps) were 2, 13, 42 and 72 for ITS, 28S, ACT and TUB, respectively. Once concatenated, the four regions resulted in a dataset showing 161 polymorphic sites and 129 parsimony informative sites.

 Table 1
 Global polymorphism of the nucleotide alignments of Plasmopara

 viticola sequences for the four genomic regions analyzed

Taxon	Locus	nª	bp <sup>b</sup>	Sc	$n_A^d$	Pi <sub>A</sub> e	$h_{d}^{f}$	$\pi^{g}$	$D^{h}$
All species	ITS	50	238	15	4	2	0.699	0.0197	_
	28S	60	702	20	8	13	0.775	0.0105	_
	ACT	88	455	52	33	42	0.941	0.0350	_
	TUB	70	519	79	32	72	0.953	0.0539	_
А	ITS	22	231	0	1	0	_	_	_
	28S	22	701	0	1	0	_	_	_
	ACT	44	455	21	13	15	0.827	0.0136	0.920
	TUB	22	519	9	11	6	0.827	0.0049	0.139
В	ITS	12	231	0	1	0	_	_	_
	28S	17	702	1	2	0	0.382	0.0005	0.566
	ACT	16	455	8	6	5	0.683	0.0072	0.739
	TUB	22	519	18	10	8	0.853	0.0074	-0.808
С	ITS	12	233	0	1	0	_	_	_
	28S	15	702	1	2	0	0.248	0.0003	-0.399
	ACT	24	455	15	13	7	0.935	0.0087	-0.043
	TUB	22	519	22	9	9	0.840	0.0075	-1.31
D	ITS	4	233	0	1	0	_	_	_
	28S	6	702	3	3	0	0.733	0.0020	0.338
	ACT	4	455	0	1	0	_	_	_
	TUB	4	519	1	2	0	0.667	0.0013	1.63

The dataset analyzed here was constructed by removing multicopy alleles within populations.

<sup>a</sup>Sample size (*n*).

<sup>b</sup>Total number of sites (bp).

<sup>c</sup>Number of segregating sites (S).

<sup>d</sup>Number of alleles ( $n_A$ ).

<sup>e</sup>Number of parsimony informative site between alleles (Pi<sub>A</sub>).

<sup>f</sup>Haplotypic (allelic) diversity ( $h_d$ ).

<sup>g</sup>Average number of differences per site ( $\pi$ ).

<sup>h</sup>Tajima's D (D).

MODELTEST indicated that the best model for the data was the General Time Reversible (GTR) model for each of the four gene regions. The phylogenies obtained from the sequence data of the gene regions were first determined separately. The main relationships among the alleles were topologically identical in the MP and ML consensus trees; therefore, we chose to show the ML tree with bootstrap values given for the well-supported branches with both methods (Fig. 2).

For each gene tree, four monophyletic lineages (A, B, C and D), each including the same isolates, were well supported (Figs 2, S1, Table S1). All pairwise comparisons of differentiation between *P. viticola* lineages measured by  $K_{\rm ST}$  were significant at  $P < 10^{-3}$  (Table S4). In the *tubulin* tree only, additional groups were supported within lineages B and C, but they did not correspond to any biological characteristics. All trees (ML, MP) generated with the different gene regions and the concatenated dataset produced congruent topologies, that is, for a given isolate, the corresponding alleles obtained by sequencing the four genes were always assigned to the same lineage (Table S1, Figs 2, S1).

Although our data provided evidence that each of the four lineages was monophyletic in each locus, the gene trees showed differing relationships between the four recognized lineages. The concatenated tree (Fig. S1) and the species tree (Fig. 3) inferred from the multilocus dataset recovered the same interspecific relationships: lineages C and D were the most closely related taxa



**Fig. 2** Maximum likelihood reconstruction of allele relationships using partial *actin* (ACT), *tubulin* (TUB), *internal transcribed spacer* (ITS) and *nrLSU* (28S) sequences. Asterisks on alleles indicate their prevalence in the dataset: no asterisk, <5; \*,  $\geq 5$ ; \*\*,  $\geq 10$ . Bootstrap values are given when superior to 70% for both the maximum likelihood and parsimony analysis. The four *Plasmopara viticola* lineages identified are labeled on the trees (A, B, C, D). The host plant of origin for each allele is indicated with a shaded box next to the allele (legend for shaded boxes is shown in the inset).

and lineage A was the most divergent taxon. This is further confirmed by our results on fixed polymorphism and on the average number of nucleotide differences per site (Table S4). It is worth noting that the phylogenetic relationships between lineages reconstructed in the concatenated dataset are mainly driven by the *tubulin* phylogenetic signal. The small number of fossil records on oomycetes and their complete absence for downy mildews rendered impossible the calibration of the trees and the estimation of the time scale for the diversification of the lineages.

The lineages were strongly associated with the host plant collected (Figs 2, 3; Table 2). Lineage A corresponded to isolates collected on *V. riparia* (n=53) and on hybrid Chancellor, and three isolates from other hybrids. Lineage B corresponded to isolates collected on *V. labrusca* and *V. aestivalis*, two isolates collected on *V. vinifera* and three isolates from hybrids. Lineage C included 11 isolates collected on *V. vinifera* and six isolates collected on three interspecific hybrids. Lineage D included the three isolates collected on *P. quinquefolia*. Except for samples collected on hybrids, samples collected from the same host plant species, but in different geographic regions, were genetically more similar than samples collected on different host species in the same fields (Table S1). Within *P. viticola* lineages collected on several host plants (A, B), no alleles were found to be associated with a given *Vitis* species, ruling out the existence of substructure driven by host plants within pathogen lineages.

#### Host specialization on Vitis spp

We assessed the ability of the P. viticola isolates from different Vitis hosts to colonize leaf tissue (pathogenicity) of wild and cultivated Vitis spp. In a first experiment, four bulk samples of isolates sampled from different hosts were inoculated on V. vinifera cv V. labrusca Chardonnay, CV Niagara, V. riparia and P. quinquefolia (Table S2). All bulk samples of isolates from a given source plant were found to grow on their host plant of origin. However, not all groups of isolates were able to infect all host plants (Fig. 4). bulkPAR was the only isolate able to infect P. quinquefolia leaves and was not able to colonize any other plants. Moreover, a hypersensitive response was observed when P. quinquefolia was inoculated with isolates from other host plants. Similarly, bulkRIP was able to infect V. riparia, but could not colonize leaf tissues of other host plants. Remarkably, bulkRIP induced a strong hypersensitive response on V. vinifera that produced numerous necrotic spots (Fig. 4a). Finally, bulkLAB and





**Fig. 3** Concatenated and species trees of *Plasmopara viticola* formae speciales. (a) Maximum likelihood tree of alleles obtained by concatenating *actin*, *tubulin*, *internal transcribed spacer* and *nrLSU* partial sequences. Bootstrap values of the branches are given for both the maximum likelihood and parsimony analyses. (b) Species tree topology recovered from the \*BEAST analysis based on the same four loci. Posterior probabilities of the branches are given in the tree. Leaf pictures indicate the source host plants for each *P. viticola* formae speciales (<sup>§</sup>, cultivated hosts).

bulkVIN were able to infect all host plants, except *P. quinquefolia*. The molecular characterization of isolates constituting the bulk samples revealed that isolates from bulkRIP belonged to lineage A, isolates from bulkPAR belonged to lineage D and isolates from bulkVIN and bulkLAB belonged to lineage B (Table S2).

These results prompted us to perform a second experiment using individual isolates from the different groups and addressing the possible quantitative differences in growth between isolates

Table 2	Distribution of the Plasmopara viticola isolates following the host
plant of	origin and the phylogenetic lineage

		P. viticola lineage				
Host plant	Variety	A	В	С	D	
Vitis riparia	Wild grape	29				
	Rootstock	1				
Vitis aestivalis	Wild grape		6			
Vitis labrusca	Niagara		24			
	Concord		2			
Vitis vinifera	Chardonnay		1	1		
	Gamay			2		
	Gewurtztraminer			1		
	Pinot noir		1	2		
	Riesling			4		
	Syrah			1		
Parthenocissus quinquefolia	Wild vine				3	
Interspecific hybrids	Chancellor	24				
	NY-73.136			2		
	Table grape		2	1		
	Traminette			1		
	Vidal		1			
	Vignoles	1				
	Unknown	2		2		

and/or interactions. *Parthenocissus quinquefolia* and its derived isolates were not used for this experiment because of the strong specificity of the interaction observed in the previous experiment. Nineteen isolates were characterized at the four molecular markers and assigned to *P. viticola* lineages. We used four isolates from *V. riparia* (RIP) and four from Chancellor (CHA), all belonging to lineage A; two isolates from *V. aestivalis* (AES) and four from *V. labrusca* (LAB), all from lineage B; and five isolates from *V. vinifera* (VIN), three from lineage B and two from lineage C (Fig. 1, Table S2).

Isolates were inoculated on all source host plants. Results obtained with individual isolates confirmed the results of the previous experiment. Isolates collected on *V. riparia* or Chancellor (RIP, CHA) were able to infect *V. riparia* and Chancellor, but never grew on leaf tissues of other host plants (except for a very limited production of spores on *V. aestivalis* with necrosis) and induced a hypersensitive response in *V. vinifera*. In addition, isolates B and C (VIN, LAB) were able to infect all host plants. However, B isolates from *V. aestivalis* (AES) were not able to infect *V. vinifera* and *V. labrusca* in our experiment. This result must be interpreted with caution as it was difficult to obtain sporulation with isolates from *V. aestivalis*, even when inoculated on their own host plant. A summary of the qualitative results from both experiments is presented in Table 3.

Quantitative analysis revealed an interesting variability in the sporulation of isolates of different source hosts when inoculated on the five host plants (Figs 4b, S2). For a given group of isolates (same source host plant and lineage of *P. viticola*), we found significant effects of inoculated host plants on sporulation and, conversely (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance,  $P < 10^{-3}$ ), for a given inoculated host plant, we found a significant effect of the isolate group on sporulation (Kruskal–Wallis one-way
analysis of variance,  $P < 10^{-2}$ ). CHA, LAB and VIN isolates, which were able to infect several host plants in the experiment, were more aggressive on their source host plant than on other host plants (Fig. 4b).

Interestingly, we observed that sporulation of downy mildew isolates, when inoculated on their host plant of origin, was lower for wild species (*V. aestivalis* and *V. riparia*) than for cultivated hosts (Chancellor, *V. labrusca, V. vinifera*; Fig. S2).

We compared, on the one hand, the sporulation of lineage A isolates (RIP, CHA) on *V. riparia* (wild) and Chancellor (cultivated), and, on the other, the sporulation of lineage B isolates



(AES, VIN, LAB) on *V. aestivalis* (wild), *V. vinifera* and *V. labrusca* (cultivated). Isolates from cultivated hosts were significantly more aggressive on cultivated hosts than were isolates from wild hosts. By contrast, no significant differences in aggressiveness between isolates were observed when inoculated on wild hosts (Fig. 5).

#### Morphological analysis

We found that sporangial size differed significantly among the four phylogenetic lineages of *P. viticola*. Lineage D isolates were significantly smaller than all the others. Lineage A and lineage C isolates were not different in size. Isolates from lineage B were found to be intermediate between A/C and D (Fig. 6a). To rule out the possibility that the differences in sporangial size were caused by the host plant, and were not intrinsic to the isolate group, we measured the size of sporangia from cross-inoculation experiments. As shown in Fig. 6(b), the size differences between different isolate groups were independent of the inoculated host plant. It is worth noting that the sporangia sizes assessed with the cell counter were different from those measured under a microscope. This is because the cell counter estimates the sporangia size by modeling a symmetric particle, whereas microscope inspection allows the measurement of the actual morphology of sporangia.

By combining phylogenetic and experimental results, we have proposed a most likely scenario for host range expansion of *P. viticola* lineages from wild to cultivated species (Fig. 7).

#### Discussion

# Evidence for several host-specific independent cryptic species of *P. viticola*

Here, we have presented several lines of evidence leading to the proposal that grapevine downy mildew is not caused by a single species, but rather by a complex of cryptic species that have radiated on the Vitaceae. Application of the GCPSR criterion (Taylor *et al.*, 2000) provided evidence that *P. viticola* includes four independent evolutionary lineages evolving without gene

Fig. 4 Host specialization in the interaction between Plasmopara viticola and the Vitaceae. (a) Pathogenicity of P. viticola isolates on different plant hosts. Leaf disks from different Vitaceae species inoculated with bulks of isolates for each source host plant (bulkPAR, Parthenocissus quinquefolia; bulkRIP, Vitis riparia; bulkLAB, V. labrusca; bulkVIN, V. vinifera). Pictures are representative of results obtained for each host-isolate combination at 7 d post-inoculation (dpi). Vitis labrusca leaves present white hairs, and sporulation on V. labrusca was only found for bulkLAB and bulkVIN. (b) Sporulation of *P. viticola* isolates on different plant hosts. Each graphic represents a group of isolates based on their source host plant (CHA, hybrid chancellor; RIP, V. riparia; AES, V. aestivalis; LAB, V. labrusca; VIN, V. vinifera) and lineages (A, B, C). Data show the mean value ( $\pm$  SEM) of the number of sporangia per group of isolates (n, number of isolates from each group multiplied by the number of replicates). Identical letters do not differ from each other at the significance level of P < 0.05 ( $\alpha = 5\%$ ) according to a Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc pairwise Wilcoxon test.

Table 3 Pathogenicity of *Plasmopara viticola* isolates from six Vitaceae source host plants inoculated on the same six host plants (the table summarizes the results of two independent cross-inoculation experiments)

		Inoculated h	iost plant				
Source host plant	P. Viticola lineage	V. riparia	Chancellor	V. aestivalis	V. labrusca	V. vinifera	P. quinquefolia
Vitis riparia	А	+ <sup>a</sup>	+	+ <sup>a</sup>	_	_a	_a
Chancellor	А	+	+	+ <sup>a</sup>	-	_ <sup>a</sup>	a
V. aestivalis	В	+ <sup>a</sup>	+	$+^{a}$	-	a	_ <sup>a</sup>
V. labrusca	В	+	+	$+^{a}$	+	+	_ <sup>a</sup>
V. vinifera	В	+	+	$+^{a}$	+	+	_ <sup>a</sup>
V. vinifera	С	+	+	$+^{a}$	+	+	_ <sup>a</sup>
Parthenocissus quinquefolia	D	_ <sup>a</sup>	_		_	_	+ <sup>a</sup>

+, *P. viticola* sporulation in at least 15% of leaf disks; –, absence of sporulation.

<sup>a</sup>Presence of necrosis in at least one of the experiments.

Colors in the table correspond to the four different *P. viticola* lineages identified: green for A, red for B, orange for C, violet for D.

flow and showing molecular divergences that might reflect distinct species. Although some of the genes presented a low phylogenetic signal (ITS, 28S), the four monophyletic lineages are well supported by independent gene genealogies, the concatenated dataset and the species tree. Isolates of *P. viticola* collected from the same host plants, but in different geographic locations, were genetically closer than isolates collected on different host species in the same field. The strong association between lineages and host plants suggests a major role of specialization in the origin and maintenance of the *P. viticola* lineages, a hypothesis supported by cross-pathogenicity tests. Two of these lineages are highly specific to their host (lineages A and D on *V. riparia* and *P. quinquefolia*, respectively), whereas lineages B and C grow on



**Fig. 5** Sporulation of *Plasmopara viticola* isolates from wild and cultivated source hosts interacting with their inoculated hosts. For lineage A isolates, the wild host is *Vitis riparia* and the cultivated host is Chancellor. For lineage B isolates, the wild host is *V. aestivalis* and the cultivated hosts are *V. vinifera* and *V. labrusca*. Data show the mean value ( $\pm$  SEM) of the sporangia number (*n*, number of isolates from each interaction multiplied by the number of replicates). Data were tested using a Kruskal–Wallis test: \*\*, *P* < 0.05; \*\*\*, *P* < 0.01.

multiple hosts and have an optimal aggressiveness on *V. labrusca* and *V. vinifera*, respectively. Finally, morphological analysis further supported the existence of the phylogenetic lineages: we observed differences in sporangial size between lineages that were independent of the host plant inoculated, indicating that this result was not caused by phenotypic plasticity of the pathogen, but rather that differences in sporangia size are genetically determined.

Therefore, *P. viticola*, an apparently well-known and widespread plant pathogen, actually hides several host-specific cryptic species that could be considered as formae speciales: *P. viticola* f. sp. *riparia* (lineage A occurring on *V. riparia* and some hybrids); *P. viticola* f. sp. *aestivalis* (lineage B found on *V. aestivalis*, *V. labrusca*, *V. vinifera* and some hybrids); *P. viticola* f. sp. *vinifera* (lineage C occurring on *V. vinifera* and some hybrids); *P. viticola* f. sp. *quinquefolia* (lineage D found on *P. quinquefolia*).

The results presented here are congruent with a previous phylogenetic study on *P. viticola*. Schröder *et al.* (2011) reported significant diversity among North American *P. viticola* isolates, giving a first hint to potential species boundaries in this species. As one of the markers used was shared with our study (*nrLSU*), we could establish that the lineages identified by Schröder *et al.* (2011) correspond to three of the cryptic species described here. However, the small number of isolates analyzed by Schröder *et al.* (2011) prevented these authors from reaching any conclusions concerning host specialization.

# Ecological specialization promotes the evolution of cryptic species of *P. viticola*

Among oomycetes, biotrophic groups, such as downy mildews and albuginales, are prime candidates for ecological speciation via host specialization. Our results on grapevine downy mildew illustrate how biotrophic plant pathogens can diversify by host plant specialization. They are in agreement with phylogenetic studies that have recently reported the presence of distinct pathogen species on a specific host plant family, including *Albugo* and *Hyaloperonospora* on Brassicaceae (Goker *et al.*, 2009; Ploch *et al.*,



**Fig. 6** Morphological analysis of sporangia of *Plasmopara viticola* isolates. (a) Samples derived from natural infections. Average ( $\pm$  SEM) length and width (µm) of sporangia of grapevine downy mildew samples assessed under the microscope using a stage micrometer. Samples are grouped by lineage (A, B, C, D). (b) Live isolates derived from the cross-inoculation experiment. Sporangia size (µm) was assessed using an automated cell counter. Isolates are grouped by source host plant (CHA, hybrid chancellor; RIP, *Vitis riparia*; AES, *V. aestivalis*; LAB, *V. labrusca*; VIN, *V. vinifera*) and by lineage (A, B, C, D). The title of each graphic indicates the inoculated plant. A mean size was calculated for each leaf disk. Bars indicate the mean size ( $\pm$  SEM) of seven replicates (seven leaf disks) of all isolates of each group: 28 values for CHA (lineage A), 28 for RIP (lineage A), 14 for AES (lineage B), 28 for LAB (lineage B), 21 for VIN (lineage B) and 14 for VIN (lineage C). Identical letters do not differ from each other at the significance level of *P* < 0.05 ( $\alpha$  = 5%) according to a Kruskal–Wallis test followed by a *post-hoc* pairwise Wilcoxon test.



**Fig. 7** Hypothetical scenario for host range expansion of *Plasmopara viticola* formae speciales from wild to cultivated hosts.

2010), *Bremia* on Asteraceae (Choi *et al.*, 2011), *Peronospora* on Fabaceae and on Lamiaceae (Garcia-Blazquez *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009; Thines *et al.*, 2009) and *Peronosclerospora* on Poaceae (Telle *et al.*, 2011). Nevertheless, the proximal mechanisms responsible for such adaptive radiation in downy mildews remain unknown. It has been proposed that the evolution of sibling oomycete species may be driven by hybridization, as has been observed for *Phytophthora* species (Brasier, 2000). However, we can discard recent hybridization in this system because the heterozygosity of *P. viticola* isolates was low within species, a result that does not fit with hybridization events.

Although many studies have addressed the host plant specificity of downy mildews using phylogenetic approaches, very few have coupled it with an assessment of the specialization of the pathogens using cross-inoculation bioassays (Mitchell *et al.*, 2011; Runge & Thines, 2012). Yet, this is an important step towards understanding the interactions in a given pathosystem, because inoculation tests provide substantial information on the study, results of the cross-inoculation experiments were mostly in agreement with the distribution of *P. viticola* cryptic species observed in natural grapevine downy mildew populations. Cryptic species A and D only infected V. riparia and P. quinquefolia, respectively, and cryptic species B and C showed optimal development on V. labrusca and V. vinifera, respectively. The host range of cryptic species B and C appeared to be larger in controlled experiments than in natural infections: both colonized leaves of V. riparia and Chancellor in controlled conditions, but we did not observe these cryptic species on these host plants in the field; similarly, cryptic species C could infect V. aestivalis and V. labrusca in the laboratory, but not in the wild. This larger host range in the laboratory could be explained by the optimization of the conditions used in bioassays: interactions are indeed favored by the use of young leaves that are known to be more susceptible to the disease and by choosing the optimal temperature and hygrometry for the growth of the pathogen. By contrast, the combination of environmental and developmental factors in the field might affect eventual disease severity and may even lead plants to escape from infection.

actual pathogenicity and aggressiveness of a given isolate. In this

# Host range expansion and quantitative adaptation to cultivated hosts

*Plasmopara viticola* is endemic to North America, where it has coevolved with wild *Vitis* spp. (Bush & Meissner, 1883). Although we lack reliable historical records, the host shift of downy mildew from wild to cultivated grapes probably occurred during the 17th century with the development of viticulture by European colonists in America. The pathogen is now well established in vineyards where it over-seasons as oospores in the soil (Kennelly *et al.*, 2007). Our data suggest that species A, which

was found on the cultivated Chancellor hybrid, probably originated from V. riparia, whereas species B, which infected V. vinifera and V. labrusca, may have originated from V. aestivalis. Colonization on novel hosts can be caused by either host range expansion (the pathogen can still infect its host of origin) or host shifts (accompanied by a loss of the ability to infect the ancestral host). Here, we found that isolates collected on cultivated hosts all remained pathogenic on their ancestral (wild) hosts. Host range expansion from wild to cultivated hosts is usually associated with quantitative adaptation to the cultivated host, even in cases in which ecological specialization is not found (Lê Van et al., 2012). In agreement with this hypothesis, the fitness of the isolates originating from cultivated varieties (CHA, VIN, LAB) was higher on their source hosts than on the other hosts. Previously, several authors have reported quantitative adaptation to the cultivar of origin for several fungal plant diseases, including rice blast caused by Magnaporthae oryzae (Bonman et al., 1989), septoria tritici blotch caused by Mycospaerella graminicola (Ahmed et al., 1996; Stukenbrock et al., 2011), potato late blight caused by Phytophthora infestans (Andrivon et al., 2007), apple scab caused by Venturia inaequalis (Lê Van et al., 2012) and wheat leaf rust caused by Puccinia triticina (Pariaud et al., 2009).

#### Implications for viticulture

Beyond the necessary revision of the taxonomic status of *P. viticola*, the results presented here have important implications for breeding for resistance to grapevine downy mildew, disease management and quarantine regulations.

First, our work highlights the importance of taking into account pathogen variability when screening germplasms for resistance to grapevine downy mildew. The differences reported by Cadle-Davidson (2008) in the identification of resistant sources between screens might result from an unrecognized structure of the pathogen, such as the cryptic species described here, or the use of virulent strains (Peressotti *et al.*, 2010; Calonnec *et al.*, 2012).

Second, the results obtained when confronting *V. vinifera* with *P. viticola* isolates derived from *V. riparia* should be taken into account for the construction of new resistant varieties. Indeed, although *V. vinifera* is highly susceptible to downy mildew, inoculation with *V. riparia*-derived isolates results in a strong necrosis, suggesting a resistance response from the plant. The *V. vinifera* genes responsible for this response should potentially be retained in the process of breeding for new varieties in order to make sure that the new varieties are resistant to *V. riparia*-derived isolates.

The unmasking of cryptic species means that some previous research on *P. viticola* will need to be revisited, because it was unclear which species were under study. Although challenging, it is also necessary to determine the agricultural importance of these newly revealed cryptic species of *P. viticola* by better assessing their spatio-temporal distribution during the course of the epidemics in vineyards. The accurate identification of plant pathogens is of particular importance to national biosecurity agencies, which have a mandate to prevent the introduction of exotic pests and pathogens. In the case of grapevine downy mildew, phylogeographical studies are now required to compare native and

introduced populations and to reconstruct the routes of invasion of the pathogen into Europe (Gobbin *et al.*, 2006; Rouxel *et al.*, 2012). An understanding of the invasive pathways and a determination of how many of the *P. viticola* cryptic species have established in Europe are crucial to assess the potential threat to viticulture represented by the introduction of new species and to help define new quarantine regulations.

#### Acknowledgements

We thank D. Gadoury (Cornell University, Ithaca, NY, USA) and A. Baudoin (Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA) for their help in grapevine downy mildew sample collection. We are grateful to J. Gillett (Michigan State University, Lansing, MI, USA) and L. Delière (INRA, Bordeaux, France) for technical assistance, E. Duchêne (INRA, Colmar, France) for help with statistical analysis and T. Giraud (CNRS, Orsay, France) for providing relevant comments on earlier versions of this article. Research was supported by the French National Research Agency (ANR-07-BDIV-003) and the Foundation Jean Poupelain (Javrezac, France).

#### References

- Ahmed HU, Mundt CC, Hoffer ME, Coakley SM. 1996. Selective influence of wheat cultivars on pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola* (Anamorph *Septoria tritici)*. *Phytopathology* 86: 454–458.
- Anderson RM, May RM. 1982. Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* 85: 411–426.
- Andrivon D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbiere R, Achbani EH, Pelle R, Ellisseche D. 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* 97: 338–343.
- Bonman JM, Bandong JM, Lee YH, Lee EJ. 1989. Race-specific partial resistance to blast in temperate japonica rice cultivars. *Plant Disease* 73: 496–499.
- Brasier C. 2000. Plant pathology the rise of the hybrid fungi. *Nature* 405: 134–135.
- Bush I, Meissner GE. 1883. Illustrated descriptive catalogue of American grape vines; a grape grower's manual. St Louis, MO, USA: R.P. Studley & Co..
- Cadle-Davidson L. 2008. Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Plant Disease* 92: 1577–1584.
- Calonnec A, Wiedemann-Merdinoglu S, Deliere L, Cartolaro P, Schneider C, Delmotte F. 2012. The reliability of leaf bioassays for predicting disease resistance on fruit. A case study on grapevine resistance to downy and powdery mildew. *Plant Pathology*. doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02667.x.
- Chen WJ, Delmotte F, Richard-Cervera S, Douence L, Greif C, Corio-Costet MF. 2007. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5162– 5172.
- Choi YJ, Shin HD, Thines M. 2009. Two novel *Peronospora* species are associated with recent reports of downy mildew on sages. *Mycological Research* 113: 1340–1350.
- Choi YJ, Thines M, Runge F, Hong SB, Telle S, Shin HD. 2011. Evidence for high degrees of specialisation, evolutionary diversity, and morphological distinctiveness in the genus *Bremia. Fungal Biology* 115: 102–111.
- Couch BC, Fudal I, Lebrun MH, Tharreau D, Valent B, van Kim P, Notteghem JL, Kohn LM. 2005. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. *Genetics* **170**: 613–630.
- Crous PW, Groenewald JZ. 2005. Hosts, species and genotypes: opinions versus data. *Australasian Plant Pathology* 34: 463-470.

Delmotte F, Chen WJ, Richard-Cervera S, Greif C, Papura D, Giresse X, Mondor-Genson G, Corio-Costet MF. 2006. Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. *Molecular Ecology Notes* 6: 379–381.

12 Research

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47–50.

Fournier E, Giraud T, Albertini C, Brygoo Y. 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97: 1251–1267.

Garcia-Blazquez G, Goker M, Voglmayr H, Martin MP, Telleria MT, Oberwinkler F. 2008. Phylogeny of *Peronospora*, parasitic on Fabaceae, based on ITS sequences. *Mycological Research* 112: 502–512.

Gavrilets S. 2004. Fitness landscapes and the origin of species. Princeton, NJ, USA: Princeton University Press.

Giraud T, Gladieux P, Gavrilets S. 2010. Linking the emergence of fungal plant diseases with ecological speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 25: 387-395.

Giraud T, Refregier G, Le Gac M, de Vienne DM, Hood ME. 2008. Speciation in fungi. Fungal Genetics and Biology 45: 791–802.

Gisi U, Waldner M, Kraus N, Dubuis PH, Sierotzki H. 2007. Inheritance of resistance to carboxylic acid amide (CAA) fungicides in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* 56: 199–208.

Gobbin D, Rumbou A, Linde CC, Gessler C. 2006. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards. *Molecular Plant Pathology* 7: 519–531.

Goker M, Voglmayr H, Blazquez GG, Oberwinkler F. 2009. Species delimitation in downy mildews: the case of *Hyaloperonospora* in the light of nuclear ribosomal ITS and LSU sequences. *Mycological Research* 113: 308–325.

Golovina NP. 1955. Sravnitelnaya karakteristika obrazov *Plasmopara viticola* Berl. et de Toni iz raznih stran. *Botanicheskie materialy otdela sporovih rastenii, Botanicheskovo instituta im. V.L. Komarova, izd. A.N. SSSR.* **10**: 138–144.

Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010. SeaView Version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221–224.

Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.

Henk DA, Eagle CE, Brown K, Van den Berg MA, Dyer PS, Peterson SW, Fisher MC. 2011. Speciation despite globally overlapping distributions in *Penicillium chrysogenum:* the population genetics of Alexander Fleming's lucky fungus. *Molecular Ecology* 20: 4288–4301.

Hudson RR, Boos DD, Kaplan NL. 1992. A statistical test for detecting geographic subdivision. *Molecular Biology and Evolution* 9: 138–151.

Kennelly MM, Gadoury DM, Wilcox WF, Magarey PA, Seem RC. 2007. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* 97: 512–522.

Le Gac M, Hood ME, Fournier E, Giraud T. 2007. Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evolution* 61: 15–26.

Lê Van A, Gladieux P, Lemaire C, Cornille A, Giraud T, Durel C-E, Caffier V, Le Cam B. 2012. Evolution of pathogenicity traits in the apple scab fungal pathogen in response to the domestication of its host. *Evolutionary Applications*. doi:10.1111/j.1752-4571.2012.00246.x.

Mayr E. 1942. Systematics and the origin of species. New York, NY, USA: Columbia University Press.

McGovern PE, Glusker DL, Exner LJ. 1996. Neolithic resinated wine. *Nature* 381: 480–481.

Millardet A. 1881. Notes sur les vignes américaines et opuscules divers sur le même sujet. Bordeaux, France: Féret & Fils.

Mitchell MN, Ocamb CM, Grunwald NJ, Mancino LE, Gent DH. 2011. Genetic and pathogenic relatedness of *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli. Phytopathology* **101**: 805–818. Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York, NY, USA: Columbia University Press.

O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Casper HH. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings* of the National Academy of Sciences, USA 97: 7905–7910.

Pariaud B, Robert C, Goyeau H, Lannou C. 2009. Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology* 99: 869–878.

Peressotti E, Wiedemann-Merdinoglu S, Delmotte F, Bellin D, Di Gaspero G, Testolin R, Merdinoglu D, Mestre P. 2010. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. BMC Plant Biology 10.

Ploch S, Choi YJ, Rost C, Shin HD, Schilling E, Thines M. 2010. Evolution of diversity in *Albugo* is driven by high host specificity and multiple speciation events on closely related Brassicaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 812–820.

Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.

Pringle A, Baker DM, Platt JL, Wares JP, Latge JP, Taylor JW. 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus. Evolution* 59: 1886–1899.

Rambaut A, Drummond AJ. 2007. Tracer v1.4: MCMC trace analyses tool. URL http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer.

Refregier G, Le Gac M, Jabbour F, Widmer A, Shykoff JA, Yockteng R, Hood ME, Giraud T. 2008. Cophylogeny of the anther smut fungi and their caryophyllaceous hosts: prevalence of host shifts and importance of delimiting parasite species for inferring cospeciation. *BMC Evolutionary Biology* 8: 100.

Rouxel M, Papura D, Nogueira M, Machefer V, Dezette D, Richard-Cervera S, Carrere S, Mestre P, Delmotte F. 2012. Microsatellite markers for characterization of native and introduced populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 6337–6340.

Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497.

Runge F, Thines M. 2012. Reevaluation of host specificity of the closely related species *Pseudoperonospora humuli* and *P. cubensis. Plant Disease* 96: 55–61.

Savulescu T, Savulescu O. 1951. Studiul morfologic, biologic si sistematic al genurilor Sclerospora, Basidiophora, Plasmopara si Peronoplasmopara. Bulletin Scientifique, Section des Sciences Biologiques, Agronomiques, Géologiques et Géographiques III: 400–409.

Scherer E, Gisi U. 2006. Characterization of genotype and mating type in European isolates of *Plasmopara viticola*. *Journal of Phytopathology* 154: 489– 495.

Schröder S, Telle S, Nick P, Thines M. 2011. Cryptic diversity of *Plasmopara* viticola (Oomycota, Peronosporaceae) in North America. Organisms, Diversity & Evolution 11: 3–7.

Steenkamp ET, Wingfield BD, Desjardins AE, Marasas WFO, Wingfield MJ. 2002. Cryptic speciation in *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* 94: 1032–1043.

Stukenbrock EH, Bataillon T, Dutheil JY, Hansen TT, Li RQ, Zala M, McDonald BA, Wang J, Schierup MH. 2011. The making of a new pathogen: insights from comparative population genomics of the domesticated wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* and its wild sister species. *Genome Research* 21: 2157–2166.

Stukenbrock EH, McDonald BA. 2008. The origins of plant pathogens in agroecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 46: 75–100.

Swofford DL. 1993. Paup – a computer-program for phylogenetic inference using maximum parsimony. *Journal of General Physiology* 102: A9.

Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA-sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437–460.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21–32.

Telle S, Shivas RG, Ryley MJ, Thines M. 2011. Molecular phylogenetic analysis of *Peronosclerospora* (Oomycetes) reveals cryptic species and genetically

distinct species parasitic to maize. *European Journal of Plant Pathology* **130**: 521–528.

- Tellier A, de Vienne DM, Giraud T, Hood ME, Refrégier G. 2010. Theory and examples of reciprocal influence between hosts and pathogens, from short-term to long term interactions: coevolution, cospeciation and pathogen speciation following host shifts. *Host–pathogen interactions: genetics, immunology and physiology.* New York, NY, USA: Nova Science Publishers.
- Thines M, Telle S, Ploch S, Runge F. 2009. Identity of the downy mildew pathogens of basil, coleus, and sage with implications for quarantine measures. *Mycological Research* **113**: 532–540.
- Viennot-Bourgin G. 1949. Les champignons parasites des plantes cultivées. Paris, France: Masson & Cie, Librairies de l'Académie de Médecine.
- Zecca G, Abbott JR, Sun WB, Spada A, Sala F, Grassi F. 2012. The timing and the mode of evolution of wild grapes (*Vitis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 736–747.

#### **Supporting Information**

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 Maximum likelihood trees of Plasmopara viticola isolates.

Fig. S2 Aggressiveness of *Plasmopara viticola* isolates assessed from the cross-inoculation experiment.

**Table S1** Detailed information on the *Plasmopara viticola* isolates used for phylogenetic analysis

**Table S2** Detailed information on the *Plasmopara viticola* isolates

 used in cross-inoculation experiments

**Table S3** Primers for the four genomic regions sequenced in *Plasmopara viticola*

 Table S4 Divergence between Plasmopara viticola phylogenetic lineages

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

### ANNEXE 2

Mélanie Rouxel, Daciana Papura, Marilise Nogueira, Virginie Machefer, Damien Dezette, Sylvie Richard-Cervera, Sébastien Carrere, Pere Mestre, François Delmotte. 2012. Microsatellite Markers for Characterization of Native and Introduced populations of *Plasmopara viticola*, the Causal Agent of Grapevine Downy Mildew. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 : 6337 – 6340.

Applied and Environmental Microbiology	Microsatellite Markers for Characterization of Native and Introduced Populations of Plasmopara viticola, the Causal Agent of Grapevine Downy Mildew
	Mélanie Rouxel, Daciana Papura, Marilise Nogueira, Virginie Machefer, Damien Dezette, Sylvie Richard-Cervera, Sébastien Carrere, Pere Mestre and François Delmotte <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 2012, 78(17):6337. DOI: 10.1128/AEM.01255-12. Published Ahead of Print 15 June 2012.
	Updated information and services can be found at: http://aem.asm.org/content/78/17/6337
	These include:
SUPPLEMENTAL MATERIAL	http://aem.asm.org/content/suppl/2012/08/08/AEM.01255-12.D CSupplemental.html
REFERENCES	This article cites 11 articles, 4 of which can be accessed free at: http://aem.asm.org/content/78/17/6337#ref-list-1
CONTENT ALERTS	Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more»

Information about commercial reprint orders: http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml To subscribe to to another ASM Journal go to: http://journals.asm.org/site/subscriptions/

Journals.ASM.org



# Microsatellite Markers for Characterization of Native and Introduced Populations of *Plasmopara viticola*, the Causal Agent of Grapevine Downy Mildew

Mélanie Rouxel,<sup>a,b</sup> Daciana Papura,<sup>a,b</sup> Marilise Nogueira,<sup>a,b</sup> Virginie Machefer,<sup>a,b</sup> Damien Dezette,<sup>a,b</sup> Sylvie Richard-Cervera,<sup>a,b</sup> Sébastien Carrere,<sup>c</sup> Pere Mestre,<sup>d,e</sup> and François Delmotte<sup>a,b</sup>

INRA, ISW, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, Villenave d'Ornon, France<sup>a</sup>; Université de Bordeaux, ISW, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, Villenave d'Ornon, France<sup>b</sup>; INRA, Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes (LIPM), Castanet-Tolosan, France<sup>c</sup>; Université de Strasbourg, UMR1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, Colmar, France<sup>d</sup>; and INRA, UMR1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, Colmar, France<sup>e</sup>

We reported 31 microsatellite markers that have been developed from microsatellite-enriched and direct shotgun pyrosequencing libraries of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. These markers were optimized for population genetics applications and used to characterize 96 *P. viticola* isolates from three European and three North American populations.

rapevine (Vitis vinifera) is cultivated worldwide, and winemaking plays an important role in the economy of many countries. Grapevine downy mildew is considered one of the most important grapevine diseases in temperate climates. Plasmopara viticola ([Berk. & Curt.] Berl. and de Toni), the causal agent of downy mildew, is a diploid heterothallic oomycete native to North America. Conducting population genetic studies on this obligate endoparasite requires the development of species-specific markers, such as microsatellites (SSRs) or single nucleotide polymorphisms (SNPs). These markers allow high-throughput genotyping of isolates through extraction of DNA directly from plant lesions, avoiding time-consuming subculture of isolates on leaves. To date, 11 microsatellites and eight SNP markers have been described in P. viticola (5, 6, 8). Related to the economic importance of this pathogen species, the low number of genetic markers available in P. viticola reflects the difficulties that were previously encountered by research groups to isolate microsatellites using traditional methods (5, 7, 8). Recent reports showed the relevance of combining the use of high-throughput sequencing technologies with bioinformatics to isolate microsatellite markers in nonmodel species (1, 11). So far, two methods based on shotgun pyrosequencing have been applied to microsatellite marker discovery: (i) direct shotgun pyrosequencing (DSP) by randomly sequencing the genome and searching a posteriori for microsatellite sequences (1, 10) and (ii) microsatellite enriched-library pyrosequencing (MEP) that uses a microsatellite-enriched library as a basis for shotgun pyrosequencing (11). Based on these two approaches, we report the development of 31 microsatellite markers for P. viticola that will increase the genotyping capacity for this major pathogen of grapevine. The new species-specific markers developed here provide the possibility of using a common set of microsatellites from local to continental geographic scales, opening the door for new genetic studies addressing P. viticola dispersal processes.

Two complementary methods were used to isolate new microsatellite markers in *P. viticola*. First, we searched for microsatellites in sequences generated by direct pyrosequencing of DNA and cDNA of *P. viticola* using the 454 genome sequencer FLX Titanium. cDNA was prepared using zoospores from strains SC and SL (see Table S1 in the supplemental material) with the Clontech

SMARTer PCR cDNA synthesis kit (Saint-Germain-en-Lave, France). Genomic DNA was prepared using zoospores from the strain Pv221 (see Table S1 in the supplemental material) with the DNeasy plant minikit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). Half a run of 454 was performed for each strain, yielding 369,105 reads (69 Mb) for SC, 419,725 reads (139.5 Mb) for SL, and 391,760 reads (130 Mb) for Pv221 (see Table S2 in the supplemental material). Perfect di- to hexanucleotide microsatellite markers with a minimum of six repeat copies were searched with SciRoKo (9), resulting in the identification of 131 nonredundant loci: 88 resulted from the direct shotgun pyrosequencing of genomic DNA of isolate Pv221, and 53 resulted from the direct shotgun pyrosequencing of cDNA of both SL and SC isolates. Primers were successfully designed for 52 of these loci using the Perl script DesignPrimer (9). Second, we applied the high-throughput method developed by Malausa et al. (11) that is based on coupling multiplex microsatellite enrichment and next-generation pyrosequencing to isolate microsatellites in the strain Pv221 (see Table S1 in the supplemental material). Briefly, an adapted biotin enrichment protocol was applied using eight biotin-labeled oligonucleotides—(AG)<sub>10</sub>,  $(AC)_{10}$ ,  $(AAC)_8$ ,  $(AGG)_8$ ,  $(ACG)_8$ ,  $(AAG)_8$ ,  $(ACAT)_6$ , and (ATCT)<sub>6</sub>—and the resulting library was sequenced by 454. This led to the identification of 2,092 microsatellite motifs among 33,057 reads (6.6 Mb) (see Table S2 in the supplemental material). The QDD pipeline (12) was used to analyze the sequences and design primers for amplification of the detected microsatellite motifs. Retaining sequences greater than 80 bp with perfect and compound microsatellites presenting a minimum of six repetitions led to the selection of 66 nonredundant loci. Therefore, the two approaches yielded a total of 118 microsatellite loci. None of the loci were common to the two approaches, and we did not

Received 18 April 2012 Accepted 5 June 2012

Published ahead of print 15 June 2012

Address correspondence to Mélanie Rouxel, melanie.rouxel@bordeaux.inra.fr. Supplemental material for this article may be found at http://aem.asm.org/. Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/AEM.01255-12

TABLE 1 Characteristics of the 35 microsatellite loci developed for Plasmopara viticola

Lonus	GenBank	$\mathbf{F}$ and $\mathbf{D}$ minute accurate $(5', 2')$	Repeat	Annealing	Size range of	Method of
Locus	accession no.	F and R primer sequences (5 –5 )	moui	temp (C)	alleles (bp)	Identification
Pv61	JQ219983	TCTTCAGGTAGATGCGACCA; GGTGACTCCTCGGACGAATA	$(CA)_9$	54	181–187	MEP
Pv65	JQ219972	CTTTGGCCCACGTCATAGTT; CGCTTTCGGTAGGTCCATTA	$(TC)_9$	57	196-202	MEP
Pv67	JQ219973	GCATTGAGCAGACACCTTGA; GAGCGATAAGACCACAAATAGTGA	$(AC)_9$	54	348-368	MEP
Pv74	JQ219984	GCAACGTTGTGCAAGCTTTA; GCATTATGATGGAGCTCACG	$(AG)_7$	54	176-182	MEP
Pv76	JQ219974	CTGGTTGCTGATGCACTGAC; GGCGGTGACTAAGTCGTTGT	$(TC)_7$	57	136-140	MEP
Pv83	JQ219985	TGCAGCATTGTTTCATCCAT; ACACGGTACTTTGCGTTCCT	$(TG)_6$	54	238-242	MEP
Pv87	JQ219986	CGTGCAATTCAAACAACAGG; CTCACAAGGACGACTGGACA	$(CT)_6$	54	152-154	MEP
Pv88	JQ219987	AATACCAAAAATGGCCGTCA; ACTCTCTTGCCAGCACCATC	$(GT)_6$	54	202-208	MEP
Pv91	JQ219975	ACCAGCCTTTGCGAAGATAA; TGAAAGTTACGTGTCGCACC	$(TG)_6$	54	142-146	MEP
Pv93	JQ219976	TAGCACCGGACTAGGCGTAT; TGTACCCTGTTGCCCTCTTC	$(GT)_6$	54	147-151	MEP
Pv96	JQ219977	TAGTCTTCAGATTTCGCCGT; ATCATTGTAAGGCCAAGAAA	$(CA)_6$	54	172	MEP
Pv100	JQ219978	TGATAAGATACCGCACAGGC; TTGTTTGAAGCACTGAACGC	$(TA)_6$	54	231	MEP
Pv101	JQ219979	AACACGGCGCCAAAGTATTA; GGGCATTAACGTGCAAATTC	(CTT) <sub>6</sub>	54	263-266	MEP
Pv102	JQ219980	GATCGCCTTTTGCAATGTCT; AAAGGAGTCAACATGCTCGC	$(TC)_6$	54	273	MEP
Pv103	JQ219981	TGACCTACCACCCATTTACCA; ACGGTCAGGTCAAAAGCAGT	$(TG)_6$	54	277-299	MEP
Pv104	JQ219982	CTACGCTCGAGGATGACACA; GACATTGCCGCACCTAAGAT	$(CA)_{6}$	54	321-324	MEP
Pv124	JQ219988	AACGACAGACGGATTTCTGC; GACCTCGAGCGCTTTGAC	(AGG) <sub>6</sub>	57	139-142	MEP
Pv126	JQ219989	GCTCTCTGCAGGACGTTTTT; GCCGTTCTTCACGTTCTAGC	$(GAC)_{10}$	50	182-206	MEP
Pv127	JQ219990	TTGAAAACGCGGATAGGAAC; GAACGTCCAGTTCGGATTGT	(CA) <sub>9</sub>	54	213-223	MEP
Pv133	JQ219991	AACGACAGACGGATTTCTGC; CGACCTCGTCTTCACTTTCC	(AGG) <sub>6</sub>	54	178-181	MEP
Pv134	JQ219992	CATGCTCACGTAGACCTCCA; AATGCAGAGCTCCCATAACG	$(AG)_6$	54	220-226	MEP
Pv135	JQ219993	GGTGCTCTGCTTCGACACTT; CGCCACACAAGTCAACTTTC	(TTC) <sub>10</sub>	57	217-220	DSPg
Pv136	JQ219994	GTTTCGCTGAAACAGAAGGC; ATCGTCCTGCCAGAAATGAC	$(CTT)_{10}$	57	161-164	DSPg
Pv137	JQ219995	AAGTGGGACACATCAAGCGT; TGGCAATAAGTTTATGCCTCG	$(AT)_{9}$	57	243-256	DSPg
Pv138	JQ219996	CGTGGATCATGACGTTTGTC; CGACGAATCAGGGACAAGAT	$(TA)_{9}$	57	225-235	DSPg
Pv139	JQ219997	GACCCGGACAATGGACTCTA; CCGCCATGTATTGAACAGTG	$(AC)_8$	57	126-133	DSPg
Pv140	JQ219998	GCTTGAGAAGAATGGAACGC; CCCAGAAGGGTGATACGAGA	$(TA)_{9}$	57	172-201	DSPg
Pv141	JQ219999	ACGACGACATGAGCTGTACG; GAAGGTGGTGTCATGGGTTT	(TC) <sub>o</sub>	57	190-192	DSPg
Pv142	JQ220000	TTATGCCACGCAAATCTCTG; AGGGCGAAATACGAGAGTGA	(CT) <sub>11</sub>	57	209-219	DSPg
Pv143	JQ220001	CCTGAATAAAGCAACACGCA; TTGGCAGCAAATTGTACGAC	$(AT)_{8}$	57	121-135	DSPg
Pv144	JQ220002	ACCAAGAATCGCACCTAACG; GTCTGCCTGTTTGTCGGTTA	$(AT)_{12}$	57	161-192	DSPg
Pv145	JQ220003	GACTTGAAGGAAGCCATCCA; CTCTCTCCAAAGTTCGTCGG	(AGA) <sub>6</sub>	57	204	DSPc
Pv146	JQ220004	CTCGGACCTTGAAGAACGAC; ACGTGGCCTAGGTTCACAAG	(GAG) <sub>7</sub>	57	242-245	DSPc
Pv147	JQ220005	TCGACTACGAGTCCGAGAGG; TTCTAGCTCGACGAAGACCG	(TCGACT) <sub>8</sub>	57	189-219	DSPc
Pv148	JQ220006	CGACCTATGTTTCGCCATTT; GAGTCGTCGTAGAAGGCGTC	(ACA) <sub>6</sub>	57	134–137	DSPc

<sup>a</sup> MEP, microsatellite-enriched pyrosequencing; DSPg, direct shotgun pyrosequencing of genomic DNA; DSPc, direct shotgun pyrosequencing of cDNA.

identify in our sequence data set the loci previously described by Gobbin et al. (8) and Delmotte et al. (5).

An initial PCR amplification was performed on a panel of 21 P. viticola isolates and on a negative control (V. vinifera). DNA extractions were performed as described in Delmotte et al. (5). PCR amplifications were carried out in a final 15-µl reaction volume including 1.5 µl of 10× buffer (Eurogentec, Belgium), 0.45 µl of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µl of 10 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 0.3 µl of a dye-labeled forward primer and an unlabeled reverse primer (10 mM), and 0.2 U of Taq Silverstar DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). PCR cycles were performed in an Eppendorf Mastercycler ep gradient with the following conditions: an initial denaturation at 94°C for 4 min and 38 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at the appropriate annealing temperature (Table 1), and 35 s at 72°C, ending with a 5-min extension at 72°C. PCR products were migrated on agarose gel (1%) with a Gene Ruler 100-bp DNA ladder (Fermentas), and those presenting irregular amplification or multiple banding patterns were discarded. The remaining 44 loci were analyzed as follows: 1 µl of PCR products (diluted at 1:100) was mixed with 8.86 µl of formamide and 0.14 µl of GeneScan 600 LIZ (internal lane size standard) and analyzed in an Applied Biosystems 3130 capillary sequencer. Alleles were scored using the GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Finally, 35 primer pairs with clearly interpretable PCR products were retained (Table 1).

In order to assess the polymorphism of these loci, we genotyped 96 P. viticola isolates from Europe and North America (see Table S1 in the supplemental material). The European samples included isolates from two French regions (Gironde, n = 16; Vaucluse, n = 16) and from the Rhine Valley in Germany (n = 16), while samples from North America originated in Michigan (n =16), New York (n = 16), and Virginia (n = 16). DNA extractions, PCR amplifications, and automated genotyping at the 35 microsatellite loci were performed as described previously. The total number of alleles per loci  $(N_a)$  and the observed and expected heterozygosity ( $H_{\rm O}$  and  $H_{\rm E}$ ) were estimated for each locus using Genetix v4.05 (2). Tests for deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were conducted using the same software, and the significance threshold was determined using Bonferroni's correction for multiple tests. The number of alleles per locus ranged from 1 to 16, with a mean ( $\pm$  standard deviation [SD]) allele number per locus of 3.9 ( $\pm$  2.8) (Table 2). In Europe, 12 loci

		Euro	ope					Nort	th Amer	rica			
	Total	Glob	al		H <sub>O</sub> for Gironde	H <sub>O</sub> for Rhine Valley	H <sub>O</sub> for Vaucluse	Glob	al		H for	H for	H for
Locus	N <sub>a</sub>	$N_{\rm i}$	$N_{\rm a}$	$H_{\rm O}$	(France)	(Germany)	(France)	$N_{\rm i}$	$N_{\rm a}$	$H_{\rm O}$	Michigan	Virginia	New York
Pv61	4	41	3	0.073	0.062	0.125		43	4	0.349	0.071	0.333	0.643
Pv65	5	42	2	0.523	0.562	0.437	0.562	25	4	0.24*	0.333	0.429	0.133*
Pv67	3	40	2	0.275	0.2	0.25	0.467	36	3	0.111	0.187	0.1	
Pv74	4	38	2	0.026*	0*	0.071		17	3	0.059*	0.25		
Pv76	4	37	1					37	3	0.027*		0.071*	
Pv83	4	41	2	0.073	0.067	0.125		38	4	0.211*	0.111	0.333	0.143
Pv87	2	42	1					45	2	0*			
Pv88	4	40	2	0.15	0.286	0.062	0.062	44	3	0.25		0.267	0.467
Pv91	3	42	2	0.261	0.125	0.562		45	3	0.178		0.25	0.267
Pv93	4	41	3	0.317	0.133	0.562	0.125	33	2	0.333		0.25	0.467
Pv96	1	42	1					32	1				
Pv100	1	31	1					0	0				
Pv101	3	42	2	0.595	0.562	0.5	0.875	27	3	0.259*		0.091	0.75
Pv102	1	30	1					0	0				
Pv103	4	42	2	0.309	0.312	0.5		46	3	0.283*	0.312	0.067	0.467
Pv104	2	42	1					39	2	0.051*		0.2	
Pv124	2	42	1					47	2	0.17		0.437	0.067
Pv126	6	42	2	0.024	0.062			42	6	0.547*	0.429	0.6	0.615
Pv127	5	39	3	0.051	0.143			35	5	0.657	0.692	0.6	0.667
Pv133	2	41	1					42	2	0.167		0.467	
Pv134	4	42	1					43	4	0.349*	0.333	0.467	0.231
Pv135	2	42	2	0.048		0.125		45	2	0.467	0.867	0.2	0.333
Pv136	2	41	1					38	2	0*			
Pv137	6	41	3	0.585	0.625	0.533	0.562	28	5	0.393*	0.143	0.571	0.286
Pv138	6	40	5	0.25*	0.312	0.312*		38	6	0.263*	0.154	0.467	0.1
Pv139	4	41	3	0.146		0.375		45	3	0.156		0.133	0.357
Pv140	9	41	8	0.683	0.867	0.437	0.75	44	7	0.454*	0.333	0.467	0.571
Pv141	2	42	2	0.548	0.562	0.375	0.875	45	2	0.511		0.733	0.8
Pv142	5	42	2	0.238	0.375	0.125	0.312	13	5	0.308*	1	0.333	
Pv143	5	42	3	0.548	0.687	0.625	0.312	44	4	0.25*	0.214	0.067	0.467
Pv144	16	42	11	0.667*	0.75	0.812	0.375*	44	11	0.204*	0.4	0.214*	0*
Pv145	1	42	1			-		45	1				
Pv146	2	42	1					34	2	0.206	0.111	0.429	
Pv147	6	42	5	0.476	0.562	0.562	0.125	46	2	0.196*	0.067	0.187	0.333
Pv148	2	42	2	0.286	0.187	0.25	0.5	43	2	0.372	0.357	0.429	0.333

TABLE 2 Population genetic analysis of 35 SSR loci in European and North American populations of *Plasmopara viticola* based on the genotyping of 96 isolates<sup>a</sup>

<sup>*a*</sup> For each population, 16 isolates were genotyped.  $N_{i}$ , number of isolates amplified;  $N_{a}$ , number of alleles;  $H_{O}$ , observed heterozygosity; \*, significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium test after Bonferroni's correction for multiple tests (P < 0.0014).

(34.2%) were monomorphic, while only two loci (5.7%) were monomorphic in North America (Pv96 and Pv145). The reduced allelic polymorphism found in the European population may likely illustrate the founder effect and the demographic bottleneck resulting from the introduction of grapevine downy mildew in Europe in the late 1870s (4). It is worth noting that two loci, found to be monomorphic in Europe, could not be successfully amplified in American isolates (Pv100 and Pv102). This result might reflect the fact that microsatellite discovery was performed on sequences obtained from European strains of the pathogen.

*Plasmopara viticola* reproduces clonally for part of the year, which can result in the spread of identical multilocus genotypes. We found 89 distinct multilocus genotypes (G) among the 96 isolates genotyped (*N*) (G/N = 0.93), indicating limited resampling of clones. The seven repeated multilocus genotypes were found in Vaucluse (n = 6) and in New York (n = 1). Since clonal amplification of genotypes can affect data interpretation, subse-

quent Hardy-Weinberg tests were performed using only one copy per multilocus genotype identified (n = 89). The expected heterozygosities ranged from 0.024 to 0.888. Among the 31 polymorphic microsatellite markers, only five presented a deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium. Significant deficits in observed heterozygotes were detected at only 3 loci (Pv74, Pv138, and Pv144) in Europe (Table 2). For North American populations, 15 loci presented a significant deficit in heterozygotes, but this number fell to 3 (Pv65, Pv76, and Pv144) when the analysis was performed separately on the 3 geographic populations (Table 2). The occurrence of null alleles is the most likely explanation for the within-population heterozygote deficits detected at these loci (3).

The combined use of high-throughput sequencing technologies and bioinformatics led to the isolation and development of 31 new microsatellite markers for *P. viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. Our results suggest that a similar approach will be successful for the discovery of microsatellites in other non-model plant-pathogenic species. These 31 new microsatellite loci provide a new tool for conducting large-scale population genetic studies that will increase our understanding of the worldwide genetic structure of this invasive plant pathogen.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by AIP Bioressources (INRA, France) and the Foundation Jean Poupelain (Javrezac, France).

We thank the following colleagues and institutes for their help with collection of grapevine downy mildew samples: D. Gadoury from Cornell University, A. Baudoin from Virginia Tech, and H. Kassemeyer from Staatliches Weinbauinstitut Freiburg.

#### REFERENCES

- Abdelkrim J, Robertson BC, Stanton JOL, Gemmell NJ. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. Biotechniques 46(3):185–191.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France. http://kimura.univ -montp2.fr/genetix/.
- 3. Chakraborty R, De Andrade M, Daiger SP, Budowle B. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. Ann. Hum. Genet. 56:45–47.

- 4. Chen WJ, et al. 2007. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. Appl. Environ. Microbiol. 73: 5162–5172.
- 5. Delmotte F, et al. 2006. Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. Mol. Ecol. Notes. 6:379–381.
- 6. Delmotte F, et al. 2011. Characterization of single-nucleotidepolymorphism markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. Appl. Environ. Microbiol. 77:7861–7863.
- 7. Dutech C, et al. 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. Fungal Genet. Biol. 44:933–949.
- 8. Gobbin D, Pertot I, Gessler C. 2003. Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis. Eur. J. Plant Pathol. **109**:153–164.
- 9. Kofler R, Schlötterer C, Lelley T. 2007. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. Bioinformatics 23(13): 1683–1685.
- Lepais O, Bacles CFE. 2011. Comparison of random and SSR-enriched shotgun pyrosequencing for microsatellite discovery and single multiplex PCR optimization in *Acacia harpophylla* F. Muell. Ex Benth. Mol. Ecol. Resour. 11:711–724.
- Malausa T, et al. 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. Mol. Ecol. Resour. 11:638–644.
- 12. Meglécz E, et al. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. Bioinformatics 26(3):403–404.

# Annexe 3

Origine géographique et plante-hôte d'origine des isolats de P. viticola utilisés dans la partie 1.2.2. traitant de la structure génétique des espèces B et C de P. viticola en fonction de la plante hôte.

				V.	V.	V.	<i>V</i> .	<i>V</i> .	
State	Site	GPS1	GPS2	aestivalis	vinifera	labrusca	cinerea	vulpina	hybrids
Canada	Lotbiniere	-71.6940	46.6377						1
	Ripon	-75.0191	45.8314						6
Floride	Lakeridge-winery	-81.7657	28.6279						10
	Road	-81.7657	29.0000	9					
	Tallahassee	-84.2085	30.5061						15
Michigan	Benton-Harbor-Saint-Joseph	-86.3573	42.0881		4	3			9
0	Clarksville	-85.2518	42.8777		10	14			-
	Fenville	-86.1538	42.6010	13	5	24			
	Gibbs-Farm	-84.5631	42.4239						4
	Jackson	-83.6296	42.6390		21				13
	Lawton	-85.8500	42.1172	2		2			
	Suttons-Bay	-85.6506	44.9767		8				
	, Traverse-city	-85.6718	44.8824		8				
New York	Geneva	-76.9777	42.8690		5				1
	Interlaken	-76.7249	42.6162		-	1			
	Knapp's	-77.0952	42.7521		6	2			
	Lamoreaux-landing	-76.8137	42.6137		6				
	Long-Island	-72.3197	41.0113		5				
	Loomis	-74.7857	41.7973		5	2			
	Res-South(dresden)	-76.9537	42.6824		1				1
	Sheldrake	-76,7016	42.6651		4				_
North					•				
Carolina	Dobson	-80.7078	36.3968		11				
	Elon	-79.4935	36.2254		4				
	Gibsonville	-79.5590	36.2190		3				
	Surry-County	-80.6771	36.3743		4				
	Warsaw	-78.0911	34.9993		1				
Ohio	Burkholder	-80.6761	41.8908	2					
	Madison(Drugovich)	-81.0471	41.7218		5	1			
	Markko	-81.7031	41.3674	3	5	1			
	Stones(madison)	-81.0498	41.7712	1		7			
Pennsvlvania	Clarion	-79.2491	41.1502	7					
,	Pittsburgh	-80.0638	40.2707					4	
Virginia	Accomack-County	-75.7617	37.6490		2				
0	Adney-gap-Road	-80.0888	37.1166	4					
	Amrhein	-80.0171	37.0999		2				
	Blacksburg	-80.4143	37.2254						4
	Fauguier-County	-77.7942	38.7198		3				2
	Greene-County	-78,4700	38.3000		5				
	Hidden-Brook	-77.2999	39.1232		5				5
	Lochmoor	-77.2970	39.1186		5				-
	Loudon-County	-77.5406	39.1143		1				
	Rockbridge	-79.2416	37.9426		4	8			5
	Shenandoah-National-Park	-78.4687	38.0588		-	-		9	•
	Surry-County	-80,6771	36.3743		2			5	2
	Warsaw	-78.0911	34,9993		4				-
West Virginia	Covington	-80,1403	37.4461	5	•				
in cor mannu	Frankford	-80,2019	37.5425	7					
	Grafton-Morgantown	-79,5458	39.3042	3					
	Philippi	-80.0338	39.1064	5			6		
	White-sulphur-springs	-80,1345	37.5515				Ũ	10	
	mine suprior springs	00.1040	21.2212					10	

Assignation des allèles de chaque isolat utilisé dans le chapitre 2 à chacun des 40 locus développés dans le chapitre 1. Annexe 4

ind	Pv14	ISA	Pv17	Pv39	Pv13	Pv31	Pv16	Pv91	Pv124	Pv93	Pv96	Pv65	Pv100	Pv102	Pv103	Pv104	Pv139	Pv136	Pv144	Pv138
Pv115	122122	138138	146146	175175	215217	240240	246246	142142	142142	148148	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131131	164164	170182	233233
Pv125	120124	138138	144146	175175	215217	240240	246246	142142	142142	148151	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131131	164164	174182	233233
Pv13	122124	138138	144146	175175	215215	238240	246246	142142	142142	151151	172172	196196	231231	273273	288299	324324	131131	164164	178184	229233
Pv256	122122	134134	144146	175175	215215	240240	249249	142142	142142	148148	172172	196196	231231	273273	288299	324324	131131	164164	176180	233233
Pv257	122124	138138	144146	175175	215215	240240	246246	142144	142142	148151	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131131	164164	180186	233233
Pv328	120124	134138	144146	175175	215215	240240	246246	142144	142142	148148	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131133	164164	178178	233233
Pv329	120124	131138	144146	175175	215215	238240	246246	142142	142142	148148	172172	196196	231231	273273	288288	324324	133133	164164	180184	231233
Pv340	122122	138138	144146	175175	215215	240240	246249	142142	142142	148151	172172	196186	231231	273273	288288	324324	129131	164164	170170	233233
Pv369	120122	131138	144150	175175	215215	238240	246249	142144	142142	148153	172172	196196	231231	273273	288299	324324	131131	164164	180184	229229
Pv375	122124	134138	144144	175175	215215	238240	246246	142144	142142	148153	172172	196186	231231	273273	288299	324324	131131	164164	180182	229229
Pv376	122122	131138	144146	175175	215215	238242	246249	142144	142142	148148	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131131	164164	184186	229229
Pv377	120122	134138	146146	175175	215217	240240	246249	142142	142142	148148	172172	196196	231231	273273	288299	324324	131131	164164	178184	229233
Pv378	120120	138138	144146	175175	215215	240240	246249	142142	142142	148151	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131131	164164	178186	229229
Pv387	120120	134138	144146	175175	215217	240240	246249	142144	142142	148151	172172	196196	231231	273273	288299	324324	131131	164164	170170	229233
Pv388	120120	138138	144146	175175	215217	240240	246249	142142	142142	148151	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131131	164164	170170	229233
Pv389	120124	131138	144146	175175	215217	240240	246249	142142	142142	148151	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131131	164164	170182	229229
Pv390	120122	134138	144146	175175	215217	240240	246249	142144	142142	148151	172172	196196	231231	273273	288299	324324	131131	164164	170182	229229
Pv392	122124	131138	144146	175175	215215	340340	246249	142142	142142	148151	172172	196186	231231	273273	288299	324324	131131	164164	170182	229229
Pv393	120122	134138	144144	175175	215215	240240	246249	142144	142142	148151	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131131	164164	178182	229229
Pv412	122124	134138	144144	175175	215215	238240	246246	142144	142142	148153	172172	196196	231231	273273	288299	324324	131131	164164	180184	229229
Pv416	120122	134138	146146	175175	215217	240240	249249	142142	142142	148148	172172	196196	231231	273273	288299	324324	131131	164164	178184	229233
Pv417	122124	138138	144146	175175	215217	240240	246249	142142	142142	148148	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131131	164164	178180	229229
Pv419	120122	134138	144146	175175	215217	240240	249249	142142	142142	148148	172172	196196	231231	273273	288299	324324	131131	164164	178184	229233
Pv91	122124	134138	144146	175175	215217	240240	246246	144144	142142	151151	172172	196196	231231	273273	288299	324324	131131	164164	170184	233233
SC	122124	134138	144146	175175	217217	240240	246246	142142	142142	148151	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131131	164164	178184	233233
SU	120124	131138	144146	175175	215215	240240	246249	144144	142142	148148	172172	196196	231231	273273	288288	324324	131131	164164	176176	229229

## **Publications**

- Mélanie Rouxel, Daciana Papura, Marilise Nogueira, Virginie Machefer, Damien Dezette, Sylvie Richard-Cervera, Sébastien Carrere, Pere Mestre, François Delmotte. 2012. Microsatellite Markers for Characterization of Native and Introduced populations of *Plasmopara viticola*, the Causal Agent of Grapevine Downy Mildew. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 : 6337 – 6340.
- Mélanie Rouxel, Pere Mestre, Gwenaëlle Comont, Brian L. Lehman, Annemiek Schilder, François Delmotte. 2012. Phylogenetic and experimental evidence for hot-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete. New Phytologist. In press.

### **Communications orales**

- Mélanie Rouxel, Pere Mestre, François Delmotte. Caractérisation de l'interaction *Plasmopara viticola / Vitis* spp. et évaluation des risques de contournement de la résistance de la vigne au mildiou. Journée des doctorants INRA département Santé des Plantes et Environnement. Dijon. 3 jours, du 8 au 10 Juin 2011.
- Mélanie Rouxel, Pere Mestre, François Delmotte. Adaptation of Plasmopara viticola, the agent of grapevine downy mildiou, to quantitavie resistance. Macrovision of viticulture, wine making and markets. Bordeaux. Du 18 au 21 juin 2012.
- Mélanie Rouxel, François Delmotte, Pere Mestre. Vers la détection de signature de sélection dans les effecteurs candidats chez le mildiou de la vigne. Réseau Ecologie des Interactions Durables, Champignons. Paris Jussieu. Le 28 novembre 2011.
- Mélanie Rouxel, Pere Mestre, François Delmotte Spécialisation plante-hôte de *P. viticola*, agent causal du mildiou de la vigne. 8<sup>ème</sup> colloque de la Société Française de Phytopathologie. AgroParisTech, Paris5ème. Du 5 au 8 juin 2012.

## Posters

- Mélanie Rouxel, Pere Mestre, François Delmotte, Caractérisation de l'interaction *Plasmopara* / *Vitis* et évaluation des risques de contournement des résistances de la vigne au mildiou. 8<sup>ème</sup> Rencontre de Phytopathologie-Mycologie de la Société Française de Phytopathologie. Aussois. Janvier 2010.
- Mélanie Rouxel, Pere Mestre, François Delmotte. Caractérisation de l'interaction *Plasmopara viticola / Vitis* spp. Journée de l'école doctorale. Arcachon. 7 avril 2011.
- Mélanie Rouxel, Pere Mestre, François Delmotte. Host plant specialization in *P. viticola*, the grapevine downy mildew Organisation Internationale de Lutte Biologique et intégrée (OILB). Lacanau. Du 2 au 5 octobre 2011.
- Mélanie Rouxel, Pere Mestre, François Delmotte. Host plant specialization in *P. viticola*, the grapevine downy mildew. Journée de l'école doctorale Arcachon. 28 mars 2012.

Mélanie Rouxel, Pere Mestre, François Delmotte. Spécialisation plante-hôte de P. Viticola agent causal du mildiou de la vigne. 9<sup>ème</sup> Rencontre de Phytopathologie-Mycologie de la Société Française de Phytopathologie. Aussois. Du 16 au 20 janvier 2012.

## **Participations diverses**

Journée des jeunes chercheurs du département Génétique et Amélioration des Plantes. Colmar. 22 et 23 avril 2010.

### TITLE

Ecology and evolution of the *Plasmopara viticola* / *Vitis* spp. interaction and risk assessment for grapevine downy mildew resistance breakdown

### ABSTRACT

Understanding the process of adaptation of parasite populations to their host-plant is a key issue in evolutionary ecology. It is also a major subject in applied research that has implications for crop protection. The oomycete *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew, attacks the species of the *Vitis* genus. In a context where the main concern of the breeding programs is the durability of resistance, new knowledge about the ecology and evolution of the interaction between parasite and host is needed in order to evaluate the potential of downy mildew to overcome the resistance. In my thesis, I addressed the role of the host-plant as an evolutionary factor for downy mildew populations, by asking this question at two different evolutionary scales: (i) in the pathogen region of origin (North America) I assessed the degree of specialization of the parasite on its wild and cultivated host range (ii) in Europe, where downy mildew has been introduced recently, I studied the evolution of downy mildew populations subject to the selection pressure imposed by resistant grapevine varieties.

To understand the host-plant specialization in this pathosystem, where several cryptic species have been identified, we performed cross inoculations between different host (*Vitis* spp.) and pathogen (*P. viticola*) species. Morphological and phenotypic data provide evidence of host-plant specialization in *P. viticola* populations: downy mildew species A and D are specialized on their host-plant, while the specialization process is ongoing for species B and C. Although no genetic differentiation has been shown inside species C, there are two distinct groups within species B. Isolates from the cultivated compartment are on average more aggressive than isolates from wild vines, indicating an adaptation of isolates growing on cultivated host-plants. Finally, a large-scale study of the distribution of downy mildew species on both their wild and cultivated host-plants resulted in the identification of a new cryptic species and confirmed the host-plant specialization.

In Europe, our results show that the limited deployment of resistant varieties has led to changes in downy mildew populations: emergence of virulent isolates (i.e. breakdown of a major QTL for resistance), and increased aggressiveness on *Vitis vinifera*. In order to understand the mechanisms at the origin of specialization and resistance breakdown, we examined the parasite's effector repertoire. Over one hundred effector candidates were identified using available data on the *P. viticola* genome. The polymorphism of 32 candidate genes revealed that three of them evolve under positive selection.

Our results reveal the strong ability of downy mildew to adapt to its host plant and to plant resistance. They should be taken into account when devising strategies for the deployment of grapevine resistances in order to guarantee their durability.

**KEYWORDS :** Host parasite interaction, disease emergence, host-plant specialization, grapevine

#### Année 2012

### Ecologie et évolution de l'interaction *Plasmopara viticola / Vitis* spp. et évaluation des risques de contournement de la résistance de la vigne au mildiou

### Mélanie Rouxel

La compréhension du processus d'adaptation des populations de parasites à leur plante-hôte est une question fondamentale en écologie évolutive. C'est également un enjeu majeur de recherche finalisée qui a des retombées pour la protection des cultures. L'oomycète *Plasmopara viticola*, agent causal du mildiou de la vigne, attaque les espèces du genre *Vitis*. Dans un contexte où l'enjeu principal des programmes d'amélioration est la durabilité des résistances, des connaissances nouvelles sur l'écologie et l'évolution de l'interaction entre le parasite et son hôte sont nécessaires afin d'évaluer le potentiel du mildiou à surmonter ces résistances. Dans ma thèse, je me suis intéressée au rôle de la plante-hôte comme facteur d'évolution des populations de mildiou, en posant cette question à différentes échelles évolutives : (i) dans le bassin d'origine du pathogène (Amérique du Nord), j'ai cherché à évaluer le degré de spécialisation du parasite sur sa gamme d'hôtes sauvages et cultivés; (ii) en Europe, où le mildiou de la vigne a été introduit récemment, j'ai étudié l'évolution des populations de mildiou soumis à la pression de sélection des résistances des nouvelles variétés de vigne.

Pour comprendre la spécialisation plante-hôte dans ce pathosystème où plusieurs espèces cryptiques ont été identifiées, nous avons réalisé des tests d'inoculations croisées entre espèces hôtes (*Vitis* spp.) et agent pathogène (*P. viticola*). Les données phénotypiques et morphologiques apportent les preuves d'une spécialisation plante-hôte au sein des populations de *P. viticola* : les espèces A et D de mildiou sont spécialisées sur leur plante-hôte, tandis que le processus de spécialisation est en cours pour les espèces B et C. Même si aucune différenciation génétique n'a été montrée au sein de l'espèce C, il existe deux groupes distincts au sein de l'espèce B. Les isolats du compartiment cultivé sont en moyenne plus agressifs que les isolats issus des vignes sauvages, indiquant une adaptation des isolats cultivés sur leur plante hôte. A partir d'un large échantillonnage, nous avons étudié la distribution des espèces de mildiou sur leurs plantes-hôtes sauvages et cultivées. Ce travail a permis d'identifier une nouvelle espèce cryptique et a confirmé la spécialisation plante-hôte.

En Europe, nos résultats montrent que le déploiement limité de variétés à résistantes partielles a conduit à des modifications des populations de mildiou: apparition d'isolats virulents (i.e. contournant un QTL majeur de résistance), et augmentation de l'agressivité sur *Vitis vinifera*. Dans le but de comprendre les mécanismes à l'origine de la spécialisation et du contournement des résistances, nous nous sommes intéressés au répertoire d'effecteurs du parasite. Une centaine d'effecteurs candidats ont été identifiés en utilisant les données disponibles sur le génome de *P. viticola*. L'analyse du polymorphisme de 32 candidats sur une sélection d'isolats montre que trois d'entre eux évoluent sous sélection positive.

Ces résultats soulignent l'importance de la plante-hôte comme facteur de diversification des populations de l'agent pathogène et révèlent que le mildiou s'adapte rapidement aux résistances de la vigne. Il est désormais nécessaire de mieux appréhender le déploiement des résistances de la vigne afin qu'elles puissent être durables.

Mots clés : Interaction hôte-parasite, maladie émergente, mildiou, spécialisation plante-hôte, vigne.





