

**AFPP – SEPTIEME CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES
MALADIES DES PLANTES
TOURS, FRANCE, 3-4-5 DECEMBRE 2003**

**SENSIBILITE DES POPULATIONS FRANÇAISES D'OÏDIUM DU BLE A
DIFFERENTS FONGICIDES : METHODOLOGIES ET PREMIERS
RESULTATS**

A-S. WALKER, P. LEROUX

INRA, Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, Route de St Cyr, 78026 Versailles, France

RESUME :

Plusieurs techniques sont disponibles pour estimer au laboratoire la sensibilité de l'oïdium du blé aux fongicides. Les méthodes moléculaires par PCR permettent de rechercher spécifiquement les allèles résistants des gènes impliqués dans la résistance aux triazoles et aux strobilurines. Ainsi, les monitorings des saisons 2001 et 2002 montrent que ces allèles sont largement répandus dans les populations d'oïdium sur le territoire français. Les méthodes biologiques permettent de vérifier la sensibilité de ce champignon à des fongicides au mode d'action inconnu comme le quinoxyfen. Le monitoring effectué en France en 2003 montre par exemple la présence localisée dans la Marne de souches résistantes à ce fongicide.

Mots-clés : *Erysiphe graminis* f. sp. *Tritici*, résistance, fongicide, méthode de détection, monitoring

SUMMARY :

**SENSITIVITY OF FRENCH WHEAT POWDERY MILDEW POPULATIONS
TOWARDS FUNGICIDES : METHODES AND FIRST RESULTS**

Several laboratory methods are available to evaluate the sensitivity of wheat powdery mildew populations towards fungicides. PCR assays enable to look specifically for resistant alleles of genes implicated in the resistance towards triazoles and strobilurins fungicides. Monitorings carried out in 2001 and 2002 showed that these alleles were widely present in the French wheat powdery mildew populations. Biological methods are used to check the sensitivity of this fungus towards fungicides whose mode of action is still unknown, such as quinoxyfen. Indeed, the monitoring carried out in France in 2003 showed isolates resistant to this fungicide, located only in the Marne region.

Key-words : *Erysiphe graminis* sp. f. *Tritici*, resistance, fungicide, detection method, monitoring

INTRODUCTION

L'oïdium du blé *Erysiphe graminis* DC f. sp. *tritici* Em. Marshal est un champignon pathogène majeur de cette culture en France et fait l'objet, conjointement à d'autres maladies, de 2 à 3 traitements phytosanitaires par saison. Cependant, la sélection de souches résistantes à diverses familles de fongicides, induite involontairement par ces pratiques, compromet leur efficacité (ANONYME, 2003). Ainsi, la résistance aux triazoles (inhibiteurs de la 14 α -déméthylation des stérols ou IDM en français et DMI en anglais) apparue dans les années 80 en Europe (BUCHENAUER & HELLWALD, 1985) reste toujours présente dans les populations françaises. Une activité résiduelle des triazoles demeure toutefois observable en pratique.

Des souches d'*E. graminis* résistantes aux morpholines (fenpropimorphe), pipéridines (fenpropidine) et spirocétalamines (spiroxamine), inhibiteurs de la Δ 14 réduction des stérols, et apparues dans les années 90 (FELSENSTEIN *et al*, 1994) sont présentes principalement dans la moitié Nord de la France. Elles affectent plus ou moins en pratique les performances de ces fongicides.

Enfin, des souches d'oïdium du blé fortement résistantes aux strobilurines (inhibitrices de la respiration mitochondriale) (résistance apparue en 1998 en Allemagne) sont détectées à de très fortes fréquences au Nord de la Loire (ANONYME, 2003).

La résistance à d'autres anti-oïdiums, comme le quinoxyfen (phenoxyquinoléines), n'est pas signalée en France à ce jour (ROUGERIE *et al*, 2000).

La résistance de ce champignon phytopathogène aux fongicides fait l'objet, par le biais de monitorings, d'une surveillance approfondie de la part des firmes phytosanitaires et des organismes impliqués dans la protection des plantes. Le groupe de travail « Résistance des Maladies des Céréales à pailles », sous l'égide de l'AFPP, participe annuellement à ces actions par des essais de terrain (efficacité des matières actives en pratique) et des études de laboratoire. Pour cette partie, plusieurs techniques ont pu être mises en œuvre, utilisant soit des outils de biologie moléculaire, soit des tests biologiques, pour diagnostiquer la résistance.

A-METHODES MOLECULAIRES D'ANALYSE DE LA RESISTANCE

MATERIELS ET METHODES

Préalablement à ces tests, l'ADN du champignon est purifié à l'aide du kit commercial d'extraction DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), à partir de 100 mg de matériel végétal parasité.

- *Résistance aux triazoles*

Cette résistance est généralement associée à une mutation du gène *CYP51* codant pour l'enzyme à cytochrome P450 éburicol 14 α -déméthylase. Cette mutation (Nucléotide 458 : Adénine \rightarrow Thyminine ; Acide Aminé 136 : Tyrosine \rightarrow

Phénylalanine) a été identifiée chez l'oïdium de l'orge *E. graminis* f. sp. *hordei* par DELYE *et al* en 1998. Des amorces allèle-spécifiques ont pu en être déduites pour *E. graminis* f. sp. *tritici* : DMIS et DMIR, amplifiant respectivement par PCR (Polymerase Chain Reaction) les allèles sensible et résistant de ce gène (tableau I). L'amplification par PCR est conduite dans un thermocycleur GeneAmp PCR 2400 (Perkin-Elmer) ; chaque réaction de 50 µl utilise 0,33 µl d'ADN polymérase Titanium 50X (BD Biosciences), 5 µl du tampon 10X spécifique fourni, 0,2 mM de chaque dNTP, 1 µM de chaque amorce (sense spécifique et reverse) et 0,2 µg d'ADN génomique à amplifier. Les conditions d'amplification sont les suivantes : 3 mn à 94°C, suivies de 7 cycles de 2 s à 94°C et 2 mn à 70°C (Touch Down PCR), puis 30 cycles de 2 s à 94°C et 2 mn à 68°C et enfin une extension finale de 4 mn à 68°C. Les produits de PCR sont visualisés sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

- *Résistance aux strobilurines*

La résistance aux strobilurines est généralement associée à une mutation ponctuelle du gène codant pour le cytochrome b intervenant dans la respiration mitochondriale (Nucléotide 228 : Guanine → Cytosine ; Acide Aminé 143 : Glycine → Alanine) (SIEROTZKI *et al*, 2000). Une méthode de génotypage *in-planta* utilisant cette mutation ponctuelle a été mise au point par FRAAIJE *et al* (2000) et a été légèrement modifiée pour ces analyses. La séquence des amorces allèle-spécifiques StrobR et StrobS est donnée dans le tableau I. La composition des réactions de PCR (à l'exception des amorces) et le programme d'amplification sont les mêmes que ceux décrits pour le génotypage de la résistance aux triazoles.

Tableau I : Séquences des amorces utilisées pour le génotypage de la résistance aux triazoles et aux strobilurines chez l'oïdium du blé.

(Primer sequences used for genotyping resistance towards triazole and strobilurin fungicides of wheat powdery mildew)

Amorce ^a		Séquence nucléotidique (5'-3')	Séquence d'acides aminés	Position relative (AA)
DMIS	s	CCTGTCTTCGGGACTGATGTAGTGTA	PVFGTDVVY	128-136
DMIR	s	CCTGTCTTCGGGACTGATGTAGTGTT	PVFGTDVVF	128-136
RCypEry	r	GCACCGTTGCAAATTGCTCGCC	GEQFATV	468-474
StrobS	s	TACGGGCAGATGAGCCACTGGGG	YGQMSHWG	136-142
StrobR	s	TACGGGCAGATGAGCCACTGGGC	YGQMSHWA	136-142
R5Strob	r	ACTCCGGTACAATAGCAGCC	PAAIVPEW	268-273

^a : s = amorce Sense ; r = amorce Reverse

RESULTATS

- *Résistance aux triazoles*

La PCR précédemment décrite permet d'amplifier des fragments d'environ 1000 pb pour les 2 allèles du gène concerné. L'amplification à partir de souches pures sensibles aux triazoles n'est visible qu'avec l'amorce DMIS alors que

l'amplification à partir de souches pures résistantes n'est visible qu'avec l'amorce DMIR.

Les ADN extraits à partir de populations de terrain présentent, pour tous les échantillons prélevés en 2001 et 2002 les 2 allèles R et S. Cependant, quelques isollements monopustules réalisés sur des échantillons de 2002 montrent la présence unique de l'allèle résistant.

Ces résultats, non quantitatifs, indiquent toutefois une forte présence de l'allèle résistant du gène *CYP51* dans les populations françaises et corroborent les échecs de traitements et les baisses d'efficacité régulièrement rapportés.

- *Résistance aux strobilurines*

La PCR permet d'amplifier des fragments d'environ 400 pb, spécifiquement avec l'amorce StrobS pour des souches pures sensibles et avec l'amorce StrobR pour des souches pures résistantes.

L'ensemble des populations échantillonnées en 2001 (32) et 2002 (34) a montré la présence soit des 2 allèles R et S pour la très grande majorité des cas, soit de l'allèle R uniquement (1 échantillon en 2001), soit de l'allèle S uniquement (2 échantillons en 2001), confirmant ainsi la forte implantation de cette résistance en France.

B-METHODES BIOLOGIQUES D'ANALYSE DE LA RESISTANCE

Si les tests moléculaires permettent de repérer rapidement dans des populations la présence de gènes de résistance à des fongicides au mode d'action connu, les tests biologiques gardent leur intérêt pour l'évaluation de la résistance globale d'un échantillon (la résistance est en effet souvent multifactorielle et non uniquement déterminée par des mutations ponctuelles) et le suivi de la sensibilité de populations à des résistances de déterminisme moléculaire non encore élucidé. De nombreuses techniques ont été décrites par différents auteurs (FRAC, 1991) ; celle décrite ci-dessous a été développée sur feuilles de blé en survie.

MATERIELS ET METHODES

- *Culture du champignon*

Les isolats d'oïdium (populations récoltées au champ ou isollements monopustules, souches de référence) sont cultivés sur feuilles de blé (première feuille ; variété Audace) de 10 jours, maintenues en survie sur milieu gélosé (agar 12,5 g/l) contenant du benzimidazole (35 mg/l). Les cultures sont conservées à 17°C et exposées à une photopériode de 16h.

- *Tests biologiques*

Ces tests permettent d'évaluer la sensibilité de souches d'oïdium en inoculant des conidies du champignon sur des feuilles de blé ayant reçu des doses croissantes de fongicide (en général 5 doses et un témoin eau). Chaque dose de fongicide est

répétée 10 fois, sous forme de 10 fragments de feuilles (3 cm prélevés dans la partie médiane de la première feuille) répartis en étoile dans une même boîte de Pétri de 9 cm de diamètre et maintenus en survie sur le milieu gélosé précédemment décrit (même conditions de culture). Les plantes peuvent être traitées avec la spécialité fongicide avant découpage (traitement de la plante entière) mais le traitement direct des fragments de feuille découpés et positionnés dans les boîtes apporte de meilleurs résultats en terme de répétitivité et d'homogénéité du traitement. Celui est effectué à l'aide d'une tour de Burgerjon, nettoyée à l'alcool et rincée à l'eau distillée stérile et calibrée pour pulvériser la solution fongicide à un équivalent de 1000 l/ha. Les boîtes ainsi traitées sont mises à sécher sous sorbonne toute une nuit. L'inoculation des souches est réalisée en agitant un inoculum (population) de 10 à 12 jours depuis le sommet d'une tour d'inoculation métallique nettoyée à l'alcool. Sous cette tour, les boîtes à inoculer sont placées sur un plateau tournant à 16 t/mn pendant 1 mn, pour assurer une bonne répartition des conidies et une bonne répétitivité des tests. L'ensemble des boîtes (doses) d'une gamme donnée est inoculé simultanément par la même souche. Les boîtes ainsi traitées et inoculées et représentant les différentes doses sont conservées séparément dans des boîtes en plastique transparent, limitant ainsi les biais induits par les éventuels effets vapeur des fongicides. Le nombre de colonies (pustules) est comptabilisé sous loupe binoculaire pour chaque répétition (fragment de feuille) de chaque dose au bout de 5 à 6 jours. L'analyse par régression linéaire permet d'estimer la CI_{50} des souches testées. A partir des gammes étalon ainsi décrites pour des souches de référence sensibles et résistantes, il est possible de déterminer des doses discriminantes utilisables dans un monitoring de grande envergure.

RESULTATS

La méthode précédemment décrite a été appliquée pour la saison 2003 prioritairement au monitoring de la résistance au quinoxyfen (phénoxyquinoléines, spécialité FORTRESS, Dow Agrosciences). Quelques résultats sont également disponibles pour des fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols et des strobilurines.

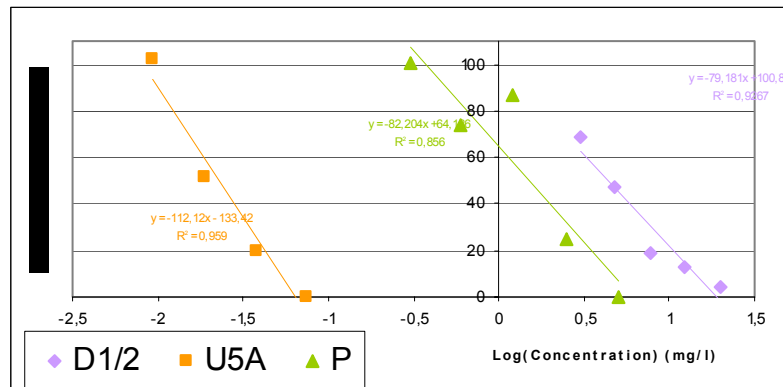
- *Sensibilité au quinoxyfen*

Les monitorings récemment pratiqués en France pour cette matière active n'ont jusqu'à présent pas mis en évidence de souches résistantes à cette matière active (BERNHARD *et al*, 2002). Cependant, des dérives de sensibilité ont été rapportées dans le Nord de l'Allemagne (ANONYME, 2003) où les conditions d'apparition de la résistance (itinéraires techniques, climat...) étaient sans doute favorables, ce qui laisse supposer l'apparition prochaine de telles souches dans d'autres pays. Des gammes étalons ont donc été réalisées en 2002 et 2003 pour des souches sensibles françaises et ont permis d'estimer la CI_{50} de ces souches à 0,024 mg/l. Des souches allemandes résistantes testées par cette méthode ont montré des CI_{50} de 4,4 à 10

mg/l, ce qui correspond à des coefficients de résistance variant entre 180 et plus de 400 (figure I). Ces 2 types de souches ont permis de proposer deux doses discriminantes (DC) : DC1 = 0,3 mg/l, permettant de séparer les souches sensibles des souches résistantes avec un coefficient de résistance (CR) supérieur à 10 et DC2 = 3 mg/l permettant de séparer des souches résistantes avec un CR supérieur 100 (figure 2).

Figure I : Réponse d'une souche de terrain sensible (U5A ; française), d'une souche de référence résistante (D1/2 ; allemande) et d'une souche de terrain résistante (P ; française) à différentes doses de quinoxyfen

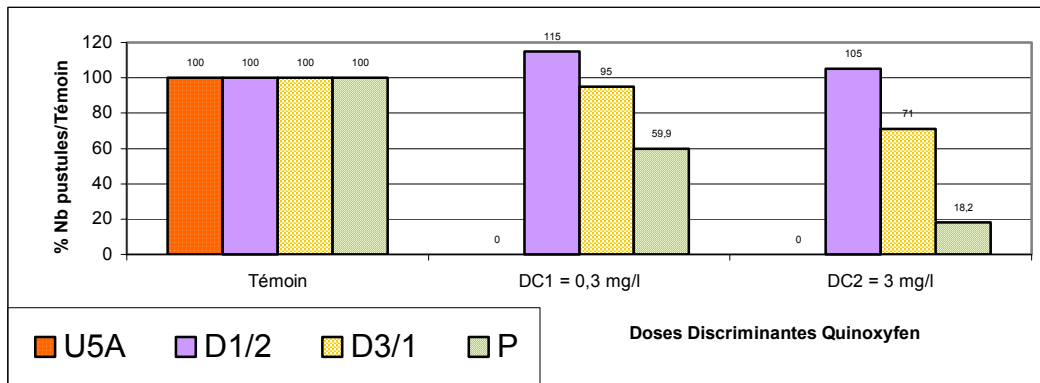
(Dose-efficacy curve of a field sensitive strain (U5A ; French), a resistant reference strain (D1/2 ; German) and a field resistant strain (P ; French) to quinoxyfen)



Pour la saison 2003, les premiers essais ont permis de mettre en évidence 12 populations provenant de la Marne (51) continuant à croître sur des feuilles traitées avec la seconde dose discriminante (figure II), ce qui laisse supposer l'émergence de souches résistantes dans cette zone localisée. Ces souches présentent des CI_{50} variant entre 1 et 1,5 mg/l, ce qui correspond à des coefficients de résistance variant de 40 à 60 (figure I). Les autres souches testées, provenant d'une large moitié Nord de la France, étaient toujours sensibles au quinoxyfen.

Figure II : Réponse d'une souche de terrain sensible (U5A ; française), de deux souches résistantes de référence (D2/1 et D3/1 ; allemandes) et d'une souche de terrain résistante (P ; française) à 2 doses discriminantes de quinoxyfen

(Efficacy of two discriminating doses of quinoxyfen on a field sensitive strain (U5A ; French), two resistant reference strains (D1/2 and D3/1 ; German) and a field resistant strain (P ; French))



- **Sensibilité aux Inhibiteurs de la Biosynthèse des Stérols (IBS)**

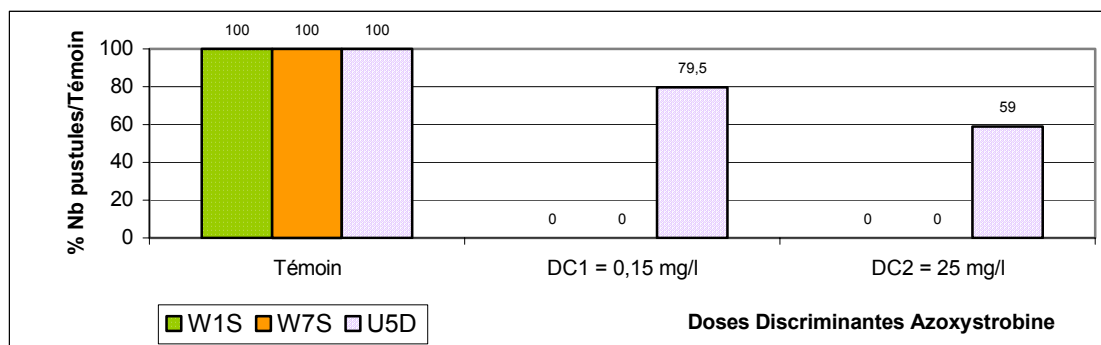
Des essais préliminaires sont en cours pour le triadiménol (triazoles, spécialité BAYTAN, Bayer Cropscience), le tébuconazole (triazoles, spécialité HORIZON EW, Bayer Cropscience) et la fenpropidine (pipéridines, spécialité GARDIAN, Syngenta Agro). Ils devraient permettre, à partir de souches de référence sensibles aux IBS et de souches résistantes prélevées au champ en 2002 de comparer entre elles les efficacités de ces matières actives au laboratoire, en relation avec les efficacités relevées dans les essais de terrain et de proposer des doses discriminantes utilisables dans le cadre des monitorings.

- **Sensibilité aux strobilurines**

Des essais avec des souches sensibles de référence (CI_{50} estimée à 0,1 - 0,2 mg/l) et des souches résistantes récoltées sur le terrain en 2002 dans la région versaillaise ont permis de déterminer, pour la méthode décrite précédemment, deux doses discriminantes. DC1 = 0,5 mg/l permet de séparer les souches sensibles des souches résistantes présentant un coefficient de résistance d'au moins 2,5 ; DC2 = 25 mg/l, permet la croissance des souches résistantes présentant un coefficient de résistance de 125 au minimum (figure III).

Figure III : Réponse de deux souches sensibles de référence (W1S et W7S) et d'une souche de terrain résistante (U5D) à 2 doses discriminantes d'azoxystrobine

(Efficacy of two discriminating doses of azoxystrobine on two resistant reference strains (W1S et W7S) and a field resistant strain (U5D))



CONCLUSION

Différentes méthodes sont donc disponibles et se complètent pour évaluer au laboratoire la sensibilité de l'oïdium du blé à différents fongicides. Les résultats apportés confirment les essais pratiqués au terrain et contribuent à affiner les recommandations de traitement pour les saisons suivantes.

Les résultats obtenus par ces méthodes sont de type qualitatif : détermination d'un génotype pour les tests moléculaires et détermination d'un phénotype pour les tests biologiques. Un enseignement quantitatif (fréquence des génotypes ou des phénotypes résistants) de la répartition de la résistance dans les populations d'oïdium du blé pourrait être obtenu par des analyses en PCR quantitative (tests moléculaires) comme cela est déjà pratiqué dans certains laboratoires et l'analyse individuelle systématique des colonies monoconidiennes récoltées (tests biologiques), ce qui reste techniquement difficile à réaliser.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Dr F. Felsenstein (Epilogic) et la société Syngenta Agro pour la fourniture des souches d'oïdium de référence. Ils remercient également l'ensemble des membres du groupe AFPP « Résistance des Maladies des céréales à paille » pour les échantillons de terrain envoyés au laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

ANONYME, 2003 – Résistance des maladies aux fongicides. Etat des lieux et recommandations, notamment pour le piétin-verse, l'oïdium et la septoriose, d'après la note commune 2003 Arvalis-Institut du végétal, INRA, SPV. *Phytoma – La défense des végétaux*, 560, 11-12.

BERNHARD U., LEADER A., LONGHURST C., FELSENSTEIN F.G., 2002 – Quinoxifen – resistance management and sensitivity monitoring in wheat : 1995-2000. *Pest. Manag. Sci.*, 58, 972-974.

BUCHENAUER H. & HELLWALD K.-H., 1985 – Resistance of *Erysiphe graminis* on barley and wheat to sterol C-14-demethylation inhibitors. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 15, 459-466.

DELYE C., BOUSSET L., CORIO-COSTET M.-F., 1998 – PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α -demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, a “recalcitrant” fungus. *Curr. Genet.*, 34, 399-403.

FELSENSTEIN F.G., STEDEN C., SPEICH J., 1994 - Shifts in morpholine sensitivity of the wheat powdery mildew pathogen, *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, and their influence on disease control. *Proc. Brighton Crop Prot. Conf. – Pests and Diseases 1994*, 475-800.

FRAAIJE B.A., BUTTERS J.A., HOLLOMON D.W., 2000 – *In planta* genotyping of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* isolates for strobilurin-resistance using fluorometric allele-specific PCR assay. *AFPP –Sixième conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours, 6-7-8 décembre 2000*, 779-786.

FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), 1991 – FRAC methods for monitoring fungicide resistance. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 21, 291-354.

ROUGERIE I., BERNHARD U., LONGHURST C., FELSENSTEIN F.G., 2000 – Quinoxifen – Sensibilité des populations d'oïdium du blé et étude de résistance croisée (1995-1999). *AFPP –Sixième conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours, 6-7-8 décembre 2000*, 827-834.

SIEROTZKI H., WULLSCHLEGER, GISI U., 2000 – Point mutation in Cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and physiology*, 68 (2), 107-112.