



BILAN : TEST DE RESISTANCE

TAVELURE 2010

Venturia inaequalis

Résumé :

Un protocole de suivi des résistances de la tavelure vis-à-vis des anilinoypyrimidines (AP) et des Inhibiteurs de la Biosynthèse des Stérols (IBS) a été élaboré en 2010 avec l'INRA d'Angers en vue de vérifier si aucune dérive dans la sensibilité des populations n'était en cours sur l'essai de prophylaxie mis en place, en 2005, sur le domaine de l'INRA (avec notamment réduction des traitements foliaires et applications essentiellement en curatif ou en stop).

Pour le cyprodinil (représentant de la famille des AP), la méthode utilisée (mise en germination des spores directement sur milieu artificiel) n'a pas donné de résultats valides en raison des difficultés rencontrées pour obtenir des taux de germination suffisants dans les boîtes témoin. De ce fait, aucune interprétation pertinente ne peut être établie à partir des données observées.

Pour les substances actives de la famille des IBS (difénoconazole et fenbuconazole), les difficultés d'obtention de monospores (par l'une et l'autre des deux structures et pour des raisons différentes) n'ont pas permis la mise en place des tests programmés.

Dans l'avenir, si ce travail devait être repris, l'amélioration de la méthode de test sur les AP devra être considérée comme une étape préliminaire indispensable à la réussite de ces suivis.

Mots-clés : Tavelure du pommier, *Venturia inaequalis*, résistance, anilinoypyrimidines, IBS

1 - PRESENTATION - CONTEXTE

En 2005, sur le domaine de l'INRA d'Angers, il a été mis en place un essai de prophylaxie Tavelure avec traitement de la litière et réduction des traitements foliaires, tous appliqués soit en curatif, soit en stop.

Pour l'instant, aucun problème d'efficacité n'a été relevé mais il serait important de savoir s'il n'y a effectivement aucune dérive dans la sensibilité des populations, dérive qui ne serait pas encore visible au terrain.

D'où la demande de tests de résistance au laboratoire vis à vis de certaines spécialités utilisées dans l'essai et dont l'évaluation a montré que le risque d'émergence de résistance n'est pas nul.

1-1 Dispositif de l'essai

De 1999 à 2000 et de 2003 à 2004 : essai non traité avec 3 parcelles en culture pure de Reine des Reinettes (traitements en Production Fruitière Intégrée (PFI) en 2001 et 2002).

2005 : restructuration par sur-greffage de parcelles en mélange.

2005 - 2009 : l'essai comprend alors 6 parcelles de 78 arbres. Trois parcelles correspondent à des témoins non traités et trois sont traitées (traitements allégés + prophylaxie)

2010 : deux modifications sont apportées sur l'essai :

- ramassage de litière dans les parcelles témoins et les parcelles traitées
- traitements des risques graves uniquement.

1-2 Objectifs

L'objectif est de réaliser des tests de résistance sur les différentes modalités (traitées/non traitées) de l'essai.

Les parcelles traitées ont reçu essentiellement : en moyenne, 2 traitements par an de spécialités IBS (difénoconazole et/ou fenconazole et/ou hexaconazole) (voir tableau 1), un traitement par an de la spécialité Chorus (cyprodinil), des produits de contact (notamment du captane).

Le verger a également été traité de 2001 à 2002 avec le même type de molécule (tableau 2) mais avec, en sus, 3 applications de pyriméthanil (2 en 2001 et 1 en 2002).

Les tests de recherche de résistance ont été réalisés sur des prélèvements effectués au printemps-été 2010 sur les différentes micro-parcelles traitées et non traitées.

Les substances actives prévues pour être testées au laboratoire sont :

- le cyprodinil comme représentant de la famille des anilinoypyrimidines (AP)
- le difénoconazole, le fenbuconazole pour la famille des IBS (Inhibiteurs de la Biosynthèse des Stérols).

Tableau 1 : traitements effectués de 2005 à 2010 sur les parcelles de modalités "traitées"

année	IBS	Dates	ANP	Dates	Dodine	Dates	Contacts	Dates
2005	hexaconazole : 1	23/05	0		1 (parcelles surgréffées)	28/06	Dithianon : 1 Tolyfluanide : 2 captane : 1	13/04 25/04; 16/06 13/05
2006	0		1	14/04	1	29/03	Dithianon : 1 Tolyfluanide : 2 captane : 1	5/05 9/05 15/05
2007	difenoconazole : 3	31/03 16/04 29/05	1	27/04	1	29/04	Captane : 1	16/05
2008	fenbuconazole : 1 hexaconazole : 1 difenoconazole : 1	15/05 26/05 2/06	1	-	2	22/04 13/03	Dithianon : 2 Captane : 1	16/04; 10/05 29/04
2009	difenoconazole : 1 fenbuconazole : 1	06/04 17/04	0	-	1	11/05	Dithianon : 2 Captane : 1	14/05; 10/05 29/04
2010	difenoconazole : 1 fenbuconazole : 1	27/05 07/06	1	07/05	0	-	0	-

Tableau 2 : traitements appliqués sur tout le verger en 2002 et 2001

année	IBS	Dates	ANP	Dates	Bénomyl*	Dates	Contacts	Dates
2001	fluquinconazole : 2 hexaconazole : 1	-	Cyprodinil : 1 pyriméthanil : 2	-	1	-	Captane : 7 Mancozèbe : 1	-
2002	difénoconazole : 1 fluquinconazole : 1 hexaconazole : 1	-	cyprodinil : 1 pyriméthanil : 1	-	0	-	Dithiannon : 1 Tolyfluanide* : 1 Captane : 5 Mancozèbe : 3	-

2 - DESCRIPTION BREVE DE LA METHODE UTILISEE

2-1 Analyses sur AP (cyprodinil)

- La méthode de test choisie initialement est la méthode de germination de spores (critère de notation : longueur du tube germinatif émis par la spore) réalisée sur la population à tester.

Pour cette méthode dite « directe », les analyses sont réalisées à partir des sporulations présentes au niveau des lésions sur les feuilles prélevées au verger.

Une gamme de 8 doses est utilisée :

0,01 – 0,03 – 0,1 – 0,3 – 1 – 3 – 10 – 30 mg/L

Pour chaque échantillon, une suspension de spores est confectionnée à une concentration moyenne d'environ 100 000 spores/mL ; la suspension est alors étalée sur un milieu Hammer (Cf Annexe) amendé en fongicide, selon la gamme de doses décrite ci-dessus. Les boîtes sont incubées, à l'obscurité, à 20 - 22°C pendant 48 heures. Les notations réalisées sous microscope évaluent le pourcentage de spores germées dans la boîte témoin ainsi que la longueur moyenne des tubes germinatifs à chaque dose. Ces notations permettent de définir, pour chacune des substances actives, les CI50 (Concentration d'Inhibition à 50% de la longueur du tube germinatif par rapport au témoin), les CI90 (Concentration d'Inhibition à 90% de la longueur) et les CMI (Concentration Minimales d'Inhibition, soit 100% d'inhibition) de chaque population étudiée. Le rapport entre la CI50 ainsi estimée et la CI50 des populations références sensibles donne le Facteur de Résistance (FR) de chaque population étudiée, ce FR permettant d'estimer son niveau de résistance.

- Néanmoins, compte tenu des résultats de cette méthode « directe » souvent difficiles à interpréter en raison des capacités de germination médiocres de *Venturia inaequalis* en milieu artificiel (à partir d'inoculum de terrain ayant reçu des traitements fongicides), cette méthode « directe » a été comparée sur deux des échantillons à une autre technique très proche mais comportant une étape supplémentaire entre le prélèvement de terrain et le test « résistance » en lui-même.

Cette étape consiste à réaliser la multiplication de la population à tester (prélevée au verger) sur des semis de pommier pour obtention de feuilles portant des lésions sporulantes n'ayant pas été en contact avec un quelconque traitement fongicide antérieur (voir paragraphe 2.3)

Les tests de résistance AP sont alors réalisés sur les nouvelles sporulations issues de ces repiquages sur jeunes semis de pommiers.

- Certaines analyses ont également été réalisées sur feuilles congelées afin de comparer les taux de germination et voir si le test direct sur feuilles congelées est possible sans passer par une multiplication de l'inoculum sur petits pommiers. Ces analyses ont permis de comparer les résultats obtenus sur des populations de spores issues de feuilles fraîches et des populations de spores issues de feuilles congelées (toutes provenant des mêmes prélèvements réalisés en 2010).

2-2 - Analyses sur IBS (difénoconazole et fenbuconazole)

La méthode de test utilisée est la méthode de mesure de la croissance mycélienne, réalisée sur des cultures monospores.

Les tests de résistance sont effectués sur 30 cultures monospores par modalité à tester.

Les produits testés sont le difénoconazole et le fenbuconazole avec une gamme de 8 doses :

0,01 – 0,03 – 0,1 – 0,3 - 1 - 3 - 10 – 30 mg/L.

Les boîtes sont incubées à 18 – 20°C et observées deux fois par semaine durant 20 jours.

Les notations sont effectuées après 20 jours d'incubation. La mesure du diamètre de la culture mycélienne est le critère de notation retenu.

2-3 Tests d'inoculation sur petits pommiers

Un volume de 50 mL de suspension de spores titrée entre 50 000 et 400 000 spores/mL est nécessaire pour inoculer une plaque de semis en godet (soit 32 plants). Les plants, de variété Granny Smith x Golden, doivent être au stade 3-4 feuilles (3 semaines de culture) pour être sensibles à la tavelure. Après pulvérisation des suspensions de spores (1 suspension = 1 plaque de semis), chaque plaque est posée dans une mini-serre avec couvercle et bien arrosée afin de conserver une hygrométrie importante pendant la phase de contamination et éviter les risques de contamination entre les plaques. Les mini-serres sont alors placées en chambre climatique sans lumière, à 18°C et 95% d'hygrométrie. Après 72 heures, les couvercles sont enlevés et la lumière allumée avec une photopériode de 12h/12h. Les feuilles sont ensuite observées au bout de 10 à 14 jours et la sporulation est prélevée pour réaliser les tests de résistance.

3 - ECHANTILLONS REÇUS

Modalité Reine des Reinettes non traité :

Echantillon n°1 reçu le 15/07/10 et testé le 21/07/10.

Echantillon n°2 reçu le 21/07/10, congelé le 21/07/10 pendant 3 mois, puis testé le 27/10/10.

Modalité Reine des Reinettes traité :

Echantillon n°3 reçu le 15/07/10 et testé le 21/07/10.

Modalité Ariane traité :

Echantillon n°4 reçu le 28/07/10 et testé le 03/08/10.

Echantillon n°5 reçu le 28/07/10, congelé le 28/07/10 pendant 3 mois, puis testé le 27/10/10.

Echantillon n°6 reçu le 4/08/10, congelé le 4/08/10 pendant 2,5 mois, puis testé le 27/10/10.

4 - RESULTATS - DISCUSSION

4-1 Tests AP (cyprodinil)

Les tests de résistance en germination de spores ont donc été réalisés à partir des feuilles sporulantes, pour certains quelques jours après réception des échantillons, pour d'autres 2 à 3 mois après congélation des feuilles.

Le tableau ci-dessous présente les résultats de CI50, CI90 et CMI pour chacun des échantillons analysés par cette méthode « directe ».

Tableau 3 : résultats des tests de résistance au cyprodinil

Variété	Réf. Modalité	Réf. Echantillon	Date Prélèvement	Date de réception	Date test	% germ. sur Témoin	CI50 mg/L	CI90 mg/L	CMI mg/L
Reine des Reinettes	témoin non traité	1	12/07/10	15/07/10	21/07/10	19	0,013	2,3]10-30]
		2		21/07/10	27/10/10 (post congélation)	8	-	-	-
	traité cyprodinil + IBS	3		15/07/10	21/07/10	15	0,027	1,9]1-3]
Ariane	Traité cyprodinil + IBS	4	26/07/10	28/07/10	03/08/10	8	-	-	-
		5			27/10/10 (post congélation)	8	-	-	-
		6	02/08/10	04/08/10	27/10/10 (post congélation)	10	-	-	-

Caractéristique de la population de référence sensible (FR 42) :

CI50 = 0,025 mg/L, CI90 = 15,5 mg/L et CMI =]10-30]

- Il est important de noter que, dans tous les cas, les résultats de cette méthode « directe » donnent des pourcentages extrêmement faibles de germination dans les témoins, Ce phénomène est récurrent en tavelure avec cette méthode mais, de ce fait, l'interprétation des analyses est délicate. Seuls les résultats obtenus avec les échantillons n° 1 et 3 sur Reine des Reinettes (avec respectivement 19 et 15% de germination dans les témoins) peuvent donner quelques indices sur le statut de résistance des populations concernées. Par contre, les échantillons n°2 (Reine des Reinettes non traité testé en post congélation) et n°4 à 6 (Ariane traités) ont des pourcentages de germination trop faibles (8 à 10%) sont inexploitable.
- En ce qui concerne les échantillons n°1 et 3 (Reine des Reinettes), ces deux populations (respectivement, non traitée et traitée, analysées directement sur les sporulations prélevées en verger) présentent des valeurs de CI50 proches de celles observées les années précédentes pour cette même substance active sur une population sensible de

tavelure (FR42 : origine verger familial éloigné de tout verger commercial). Mais, compte tenu des pourcentages de germination obtenus dans les témoins avec cette méthode, il est extrêmement difficile de tirer des conclusions fiables à partir de ces données.

- En ce qui concerne les tests sur Ariane, aucun échantillon n'est exploitable du fait du très faible pourcentage de germination dans les témoins.
- Les tests réalisés après congélation indiquent que la phase de congélation provoque une chute de germination chez Reine des Reinettes (le taux passe de 19 à 8%). Sur Ariane, on retrouve le même taux de germination très faible, après congélation comme en frais.

4.2 Tests IBS

Les cultures monospores destinées à ces tests IBS n'ayant pas pu être fournies par l'INRA comme initialement prévu dans le protocole, les différents échantillons de feuilles conservés en congélation (déjà utilisés pour les tests sur cyprodinil) ont été repris au laboratoire de l'Anses-Lyon pour tenter de constituer les 30 monospores par modalité.

La méthode employée a été la suivante : les monospores sont réalisées sous loupe binoculaire sous hotte stérile avec mise en culture sur du milieu PDA additionné de chloramphénicol à 100 mg/L (afin de limiter le développement de bactéries). Les boîtes sont ensuite incubées à 16°C ; 15 jours après, les cultures sont repiquées sur PDA. Trois à quatre semaines après, le développement mycélien est suffisant pour la réalisation des tests.

Trois tentatives ont été entreprises courant 2011 : le 28 avril (80 monospores par modalité), le 23 juillet (80 monospores par modalité) et le 22 décembre (80 monospores par modalité). Aucune de ces mises en culture de monospores n'a pu donner de culture mycélienne (développement de pollution : bactérie, rhizopus et penicillium).

4.3 Tests d'inoculation sur petits pommiers

Deux suspensions de spores ont été réalisées : une avec l'échantillon n°1 (Reine des Reinettes non traitée) et l'autre avec l'échantillon n°3 (Reine des Reinettes traitée). Les feuilles ayant été utilisées immédiatement avant pour la réalisation des tests sur cyprodinil, il n'a pu être constitué que 50 mL de suspension de spores à 50 000 spores/mL.

Pour les deux échantillons, aucun symptôme de tavelure n'a été observé après 2 semaines, 3 semaines et 4 semaines de culture. Par contre, de nombreuses contaminations d'oïdium se sont développées rapidement sur les feuilles. Aucun traitement n'a pu être réalisé afin de limiter ce développement.

5 - CONCLUSION

Comme il était redouté, cette étude n'a pas apporté les résultats escomptés. En effet, concernant la famille des anilinopyrimidines, compte-tenu de la méthode utilisée (spores directement mise en conditions de germination sur milieu artificiel) et des difficultés rencontrées pour l'obtention de taux de germination suffisants dans les boîtes Témoin non amendées en fongicides, les résultats obtenus ne peuvent être validés et aucune interprétation pertinente ne peut être établie à partir des données observées.

Les échecs enregistrés avec les tentatives de modifier la méthode initiale (soit par congélation préalable des feuilles prélevées, soit par introduction d'une phase de multiplication sur semis) n'ont pas permis de suppléer aux défauts de la méthode en test direct.

Pour les substances actives de la famille des IBS, les difficultés d'obtention de monospores (soit par manque de temps à l'INRA, soit, probablement, du fait de l'utilisation d'échantillons restés particulièrement longtemps au congélateur à l'Anses-Lyon), n'ont pas permis la mise en place des tests programmés.

Si une telle étude devait être reprise dans l'avenir, il serait absolument nécessaire, pour la famille des AP, d'utiliser une méthode permettant d'assurer une meilleure validité des résultats. Cette évolution pourrait être réalisée soit par une meilleure maîtrise de la phase de multiplication sur jeunes semis, soit par l'utilisation de la méthode de croissance mycélienne de cultures monospores (beaucoup plus lourde mais communément utilisée pour les IBS).

6 - PARTENAIRE SCIENTIFIQUE

- INRA Angers – UMR PaVé – 42 rue Georges Morel – BP 60057 - 49071 – Beaucouzé Cedex

7 - BIBLIOGRAPHIE

- F. Remuson *et al*, 2003 – La tavelure des pommes (*Venturia inaequalis*) : comportement aux Inhibiteurs de la Biosynthèse des Stéroïdes (IBS). 7^{ième} Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, 9 pp.

ANNEXE

COMPOSITION MILIEU DE HAMMER

Glucose	:	20 g/L
Agar	:	20 g/L
K ₂ HPO ₄	:	1 g/L
MgSO ₄	:	0,5 g/L
KCl	:	0,5 g/L
FeSO ₄	:	0,01 g/L
Asparagine	:	2 g/L