

Résistance du Botrytis de la tomate (*Botrytis cinerea*) vis-à-vis des fongicides

PLANS DE SURVEILLANCE 2012 et 2013

RESUME

Les plans de surveillance de 2012 et 2013 concernant la résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides en culture de tomate ont permis d'analyser les profils de résistance de 10 populations provenant de diverses régions (Aquitaine, Bretagne, Centre, Ile de France, Basse Normandie et Pays de la Loire).

Ces suivis permettent de suivre l'évolution de la fréquence des souches résistantes aux différentes familles chimiques. Ils ont été réalisés par mise en place de tests biologiques.

Les résultats obtenus montrent que, sur les cinq familles chimiques autorisées dans la lutte contre la pourriture grise sur tomate (dicarboximides, anilinopyrimidines, hydroxylanilides, QoI et carboxamides), toutes peuvent être concernées par une résistance spécifique avec, pour chacune d'entre elles, quelques populations concernées et des taux plus ou moins élevés de souches résistantes.

Enfin, des souches "multidrug résistante" (MDR1 et MDR2) ont aussi été détectées, avec des fréquences faibles, dans une parcelle testée en 2012.

Les différents profils de résistance observés entre les populations analysées sont à relier aux stratégies de traitement adoptées et donc aux pressions de sélection exercées sur chacune des parcelles échantillonnées.

Mots clés : *Botrytis cinerea*, plan de surveillance, résistances, tomate

1 - Contexte

1.1 - La maladie

La pourriture grise due à *Botrytis cinerea* est l'une des maladies aériennes les plus importantes sur tomate notamment sous abri, car les dégâts ont des répercussions directes sur le rendement et sur la qualité de la récolte. L'application de traitements fongicides est la principale méthode de lutte utilisée ; néanmoins l'efficacité des traitements peut être perturbée par la présence dans les serres de souches du champignon résistantes aux fongicides.

Les attaques du champignon s'observent sous forme de lésions du tissu (ou chancres) sur la tige au niveau des plaies (effeuillage, ébourgeonnage,..) mais aussi sous forme de pourriture au niveau des fruits aussi bien avant qu'après récolte. Des taches nécrotiques prenant un aspect d'anneaux concentriques peuvent se développer sur les feuilles entraînant des dessèchements.

Les facteurs climatiques, en particulier l'hygrométrie, ont un rôle important sur le développement de la maladie en favorisant la germination des conidies. *Botrytis cinerea* est aussi un parasite de blessures : si l'inoculum est présent, les facteurs favorisant les attaques sont en particulier les nécroses et les plaies. Enfin *Botrytis cinerea* est un parasite de faiblesse : toutes les opérations qui provoquent un affaiblissement de la plante (changements climatiques, fertilisation,...) peuvent favoriser les attaques et le développement du champignon (source : Viennot-Bourgin).

1.2 - Le plan de surveillance

Les plans de surveillance 2012 et 2013 concernant la résistance de la pourriture grise sur tomate ont visé l'ensemble des cinq familles chimiques utilisées contre la pourriture grise en culture de tomate. Chez *Botrytis cinerea*, deux types de résistance peuvent être observées : une résistance spécifique (résistance à un seul mode d'action par mutation spécifique du gène codant pour la cible du fongicide) qui concerne chacun des cinq groupes chimiques et une multi résistance (résultant d'une excrétion cellulaire accrue de fongicides appartenant à plusieurs familles chimiques) qui concerne quatre des groupes chimiques autorisés sur cet usage (tableau 1).

Tableau 1 : Familles chimiques utilisées dans la lutte contre la pourriture grise de la tomate

Groupes ou familles chimiques	Substances actives	Résistance spécifique	Résistance multiple (MDR)
Anilino-pyrimidines (ANP)	pyriméthanil	oui	oui
SDHI (carboxamides)	boscalid	oui	oui
Dicarboximides	iprodione	oui	oui
Hydroxylanilides	fenhexamid	oui	oui
QoI	pyraclostrobine	oui	non

2 - Description brève de la méthode utilisée

Il s'agit d'une méthode d'analyse basée sur des tests biologiques (Leroux et *al.* 1984).

Les tests de laboratoire sont réalisés sur conidies de *Botrytis cinerea*. Les fongicides testés sont utilisés sous forme de produits techniques, dissous dans l'éthanol ; ils sont incorporés dans un milieu gélosé à des doses discriminantes de fongicides afin de rechercher la fréquence des différents phénotypes résistants.

Un milieu témoin (amendé uniquement avec la solution d'éthanol) accompagne chaque test. Ces milieux sont ensuite coulés en boîte de Petri de diamètre 55 mm.

La suspension de spores (d'environ 100 000 à 150 000 spores/mL), réalisée dans l'eau stérile à partir des cotons-tiges contenant la sporulation du champignon, est alors déposée à la surface des milieux gélosés et amendés, à raison de 250 µL par boîte. Les boîtes sont ensuite mises en incubation de 24 à 48 heures à 20°C et à l'obscurité.

Notation :

Après incubation, l'observation des spores au microscope permet de déterminer la proportion de souches résistantes de chaque population (échantillon). Les pourcentages de germination ainsi que la proportion de conidies présentant des filaments d'une longueur supérieure ou égale à 50% de celles des conidies témoin sont évalués sous microscope. Seuls sont validés les résultats des échantillons présentant un pourcentage de germination dans les témoins d'au moins 50%. A partir de ces résultats, sont déterminés pour chaque région viticole et pour chaque phénotype :

- le pourcentage moyen d'échantillons résistants, soit la fréquence de populations présentant au moins une souche résistante,
- le pourcentage moyen (ou fréquence) de souches résistantes dans les parcelles concernées.

3 - Prélèvements des échantillons

Les prélèvements de conidies sont réalisés à l'aide de cotons-tiges sur les fruits (ou les tiges) sporulants à raison de 30 fruits (ou tiges), issues de 30 pieds de tomate différents par parcelle. Six cotons-tiges permettent de réaliser l'échantillonnage d'une parcelle (soit 5 fruits (ou tiges) par coton-tige).

Tableau 2 : Nombre d'échantillons analysés au cours des années 2012 et 2013

Région	Echantillons programmés	Echantillons reçus	Echantillons avec résultats exploitables
2012			
Aquitaine	4	4	4
Bretagne	4	0	
Languedoc-Roussillon	4	0	
Pays de la Loire	4	2	2
PACA	4	0	
Rhône-Alpes	4	0	
2013			
Bretagne	1	1	1
Centre	1	1	1
Ile de France	1	1	1
Basse Normandie	1	1	1
PACA	1	0	0

4 - Résultats et discussion

Les tableaux n°3 et n°4 présentent les résultats obtenus sur les échantillons prélevés respectivement en 2012 et 2013, vis-à-vis de différentes familles chimiques.

Les différents phénotypes résistants sont libellés comme suit :

- **ImiR1** : souches résistantes aux **dicarboximides** (iprodione)
- **AniR1** : souches fortement résistantes aux **anilinopyrimidines** (pyriméthanil)
- **HydR3** : souches résistantes aux **hydroxylanilides** (fenhexamid)
- **QoIR** : souches résistantes aux **QoI** (pyraclostroline)
- **CarR** : souches résistantes aux **carboxamides** ou SDHI (boscalid)
- **MDR1** : souches résistant faiblement, et simultanément, aux **anilinopyrimidines**, aux **phénylpyrroles*** et dans une moindre mesure aux **dicarboximides**, aux **pyridinamines*** et aux **carboxamides**
- **MDR2** : souches résistant faiblement, et simultanément, aux **anilinopyrimidines**, aux **dicarboximides**, aux **hydroxylanilides**, aux **carboxamides** et aux **IDM***
- **MDR3** : souches combinant les résistances de type **MDR1** et **MDR2** (souches résistant faiblement, et simultanément, aux **anilinopyrimidines**, aux **dicarboximides**, aux **hydroxylanilides**, aux **carboxamides**, aux **IDM***, aux **phénylpyrroles*** et aux **pyridinamines***).

* les substances actives concernées par ce mode d'action ne sont pas autorisées sur l'usage pourriture grise en France.

4.1 – Résultats 2012

Tableau 3 : Résultats obtenus sur les échantillons 2012

Région	N° labo 2013. Anses	Référence expéditeur	% germination / témoin	% de souches							
				ImiR1	AniR1	HydR3	QoI R	CarR	MDR1	MDR2	MDR3
Aquitaine	390	12 AQ-47-01	80	0	0	0	0	0	0	0	0
	391	12 AQ-47-02	58	0	40	0	0	0	0	0	0
	392	12 AQ-47-03	95	0	0	0	0	0	0	0	0
	440	12 AQ-47-04	63	43	35	0	0	0	0	0	0
Pays-de-la-Loire	334	12-PDL-44-01	59	0	24	0	0	20	4	15	0
	441	12-PDL-44-02	77	0	0	0	0	0	0	0	0

En 2012, la résistance aux **dicarboximides** (iprodione) a été détectée dans une seule population (sur les six analysées) avec un taux de résistance de 43%. Cette population provient d'une parcelle de la région Aquitaine. Au niveau traitement chimique, elle a reçu un traitement iprodione en 2012 et aucune autre application de cette substance active entre 2008 et 2011 (aucune information sur les traitements réalisés avant 2008 n'a été communiquée).

Pour les cinq autres parcelles, il n'a pas été décelé de populations résistantes aux dicarboximides.

La résistance spécifique aux **anilinopyrimidines** (pyriméthanil) a été détectée dans trois populations sur six : deux (sur quatre) en Aquitaine et une (sur deux) en Pays-de-la-Loire, avec des taux de souches résistantes allant de 24% à 40% selon les parcelles.

La résistance aux **hydroxylanilides** (fenhexamid) n'a été détectée dans aucune des six parcelles analysées. Les populations se sont toutes avérées sensibles.

De même, la résistance aux **QoI** (pyraclostrobine) n'a pas été détectée dans les populations analysées.

La résistance aux **carboxamides** (boscalid) a été détectée dans une seule population prélevée en Pays-de-la-Loire, avec un taux de souches résistantes de 20%.

La **résistance multiple** (MultiDrug Resistance ou **MDR**) a été décelée dans une seule parcelle en Pays-de-la-Loire (avec une fréquence relativement faible de 4% en MDR1 et de 15% en MDR2). Mais, il faut noter que cette même population présente, en parallèle, un taux de résistance spécifique de 24% aux anilinoypyrimidines et correspond à l'unique population avec une résistance spécifique aux carboxamides.

L'observation des stratégies de lutte mises en œuvre sur cette parcelle depuis 2010 montre l'application de 2 traitements de l'association boscalid + pyraclostrobine en 2012, 2 en 2011 et 3 en 2010. Il y a probablement un lien entre l'intensité de ces traitements avec une même association (sans autre alternance de familles chimiques) pendant 3 ans et la présence de souches résistantes aux anilinoypyrimidines et aux carboxamides ainsi que probablement la présence de souches MDR de type MDR1 et MDR2.

4.2 – Résultats 2013

Tableau 4 : Résultats obtenus sur les échantillons 2013

Région	N° labo Anses.	Référence expéditeur	% germination / témoin	% de souches							
				ImiR1	AniR1	HydR3	QoI R	CarR	MDR1	MDR2	MDR3
Basse-Normandie	13-292	13-BN-14-01	72	100	49	0	0	0	0	0	0
Bretagne	13-144	13-BR-22-01	61	0	53	0	0	0	0	0	0
Centre	13-188	13-CE-37-01	82	63	28	40	27	0	0	0	0
Ile-de-France	13-056	13-IdF-91-01	80	100	47	0	0	0	0	0	0

En 2013, la résistance aux **dicarboximides** (iprodione) a été détectée dans trois des quatre populations analysées avec des taux de souches résistantes élevés (63% pour la parcelle de la région Centre) à très élevés (100% pour les parcelles d'Ile de France et de Basse Normandie). Au niveau traitements chimiques, 2 des 3 populations concernées ont reçu des traitements iprodione : 1 traitement en 2013 pour la parcelle 13-188 de Centre, 3 traitements en 2013 et 4 en 2011 pour la parcelle 13-292 de Basse-Normandie. Pour la parcelle Ile de France, aucune donnée sur le nombre de traitements n'a été communiquée.

La résistance spécifique aux **anilinoypyrimidines** (pyriméthanil) a été détectée dans toutes les populations, avec des taux de souches résistantes allant de 28% à 53% selon les régions.

La résistance aux **hydroxylanilides** (fenhexamid) n'a été détectée que dans une seule parcelle, celle de la région Centre (avec 40% de souches résistantes).

La résistance aux **QoI** (pyraclostrobine) a été détectée dans cette même parcelle de la région Centre (avec 27% de souches résistantes).

Pour ces trois dernières familles chimiques, aucune information n'a été communiquée sur les historiques de traitements.

Par contre, contrairement à 2012, la résistance aux **carboxamides** (boscalid) n'a été détectée dans aucune des parcelles analysées, de même que la **résistance multiple** (MultiDrug Resistance ou **MDR**).

Enfin, il faut noter que les résultats observés sur la parcelle de la région Centre sont assez inquiétants dans la mesure où des souches résistantes sont détectées à toutes les familles chimiques autorisées excepté vis-à-vis de celle des carboxamides. Le manque d'information dans le calendrier de traitements (seul un traitement iprodione en 2013 a été renseigné) ne permet pas d'établir un lien entre les résultats et les traitements chimiques appliqués.

5 - Conclusion – Perspectives

Les résultats obtenus entre les deux années 2012 et 2013 sont assez hétérogènes ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les régions échantillonnées n'ont pas été les mêmes entre les deux années. Mais, ces différences sont plus probablement à relier aux stratégies de traitement adoptées et donc aux pressions de sélection exercées sur chacune des populations analysées.

Sur le total des dix parcelles qui ont fait l'objet de ces suivis 2012 et 2013, le devenir de deux d'entre elles serait à suivre particulièrement : les parcelles PDL 44-01 de 2012 et CE 37-01 de 2013 dont les populations présentent plusieurs types de résistances, résistances spécifiques (notamment pour la population de Centre), doublées de résistances de type MDR (population de Pays de Loire). Les stratégies de traitement adoptées pour ces parcelles seraient probablement à faire évoluer pour tenter de limiter l'extension des souches résistantes en présence.

6 - Partenaires scientifiques et techniques

- **INRA : Anne-Sophie Walker** – INRA-UMR 1290 Bioger-CPP - Bât 13, Avenue Lucien Brétignières , BP01 - 78850 Thiverval-Grignon France
- **Personne Ressource** : Sophie Szilvasi – SRAL Nord-Pas-de-Calais
- **Réseau des DRAAF-SRAL et des organisations professionnelles dans le cadre de la Surveillance Biologique du Territoire (SBT)** pour la participation aux prélèvements.

7 - Bibliographie

- Leroux P., Besselat B., 1984. Pourriture grise : la résistance aux fongicides de *Botrytis cinerea*. *Phytoma* 359, 25-31
- Leroux P., Walker A.S., 2009. La résistance aux fongicides de type MDR (multidrug resistance) chez les champignons phytopathogènes : mythe ou réalité ? *9^{ème} Conférence internationale sur les Maladies de plantes de l'AFPP, Tours, 8 et 9 décembre 2009. Session Résistances.*
- Viennot-Bourgin G., 1949. Les champignons parasites des plantes cultivées.

8 - Annexes

8.1 - Résultats d'analyses par région – 2012

8.2 - Résultats d'analyses par région - 2013

8.1 - Résultats d'analyses par région – 2012

Tests résistance *BOTRYTIS cinerea* Tomate 2012

Analyses réalisées par : Laboratoire Anses - Lyon
Unité RPP
31 avenue Tony Garnier
69364 LYON Cedex 07

Types de souches :

ImiR1 = résistantes à la vinchlozoline 5 mg/L = **Résistantes Imides cycliques**

AniR1 = résistantes au Pyriméthanol 1,5 mg/L = **moyennement à hautement résistantes aux anilinoypyrimidines**

HydR3 = résistantes au fenhexamid 4mg/L = **Résistantes au fenhexamid**

QoI R = résistantes à l'azoxystrobine 10 mg/L = **Résistantes aux QoI**

CarR = résistantes au Boscalid 7 mg/L = **Résistantes aux carboxamides**

MDR1 (AniR2) = faiblement résistantes aux anilinoypyrimidines et moyennement résistantes au fludioxonil

MDR2 (AniR3) = faiblement résistantes aux anilinoypyrimidines, fenhexamid et IDM

MDR3 (MDR1 et MDR2) = faiblement résistantes aux anilinoypyrimidines, fenhexamid et IDM - moyennement résistantes au fludioxonil

N° labo 2012.Anses.	Région	Référence parcelles	date prélèvement	date réception	Date test	analyse sur	% germination / témoin	% de souches							
								ImiR1	AniR1	HydR3	QoIR	CarR	MDR1	MDR2	MDR3
390	AQ	Bot T 12 AQ-47-01	20/09/12	21/09/12	02/10/12	Prélèvement sur tomates avec écouvillons	80	0	0	0	0	0	0	0	0
391		Bot T 12 AQ-47-02	20/09/12	21/09/12	03/10/12	Prélèvement sur tomates avec écouvillons	58	0	40	0	0	0	0	0	0
392		Bot T 12 AQ-47-03	20/09/12	21/09/12	08/01/12	culture sur Malt Levure	95	0	0	0	0	0	0	0	0
440		Bot T 12 AQ-47-04	08/10/12	21/09/12	10/10/12	Prélèvement sur tomates avec écouvillons	63	43	35	0	0	0	0	0	0
334	PL	PDL-44-01	22/08/12	24/08/12	25/09/12	Prélèvement sur tiges avec écouvillons	59	0	24	0	0	20	4	15	0
441		PDL-44-02	15/10/12	16/10/12	23/10/12	Prélèvement sur tiges avec écouvillons	77	0	0	0	0	0	0	0	0

8.2 - Résultats d'analyses par région - 2013

Tests résistance *BOTRYTIS cinerea* Tomate 2013

Analyses réalisées par : Laboratoire Anses - Lyon
Unité RPP
31 avenue Tony Garnier
69364 LYON Cedex 07

Types de souches :

ImiR1 = résistantes aux **dicarboximides** (iprodione)

AniR1 = moyennement à hautement résistantes aux **anilino-pyrimidines** (pyriméthanol)

HydR3 = résistantes aux **hydroxyanilides** (fenhexamid)

QoI R = Résistantes aux **QoI (pyraclostroline)**

CarR = Résistantes aux **SDHI** (boscalid)

MDR1 = faiblement résistantes aux **anilino-pyrimidines** (pyriméthanol) *(et moyennement résistantes aux phénylpyrroles (fludioxonil))*

MDR2 = faiblement résistantes aux **anilino-pyrimidines** (pyriméthanol), **hydroxyanilides** (fenhexamid) *(et IDM)*

MDR3 (MDR1 et MDR2) = faiblement résistantes aux **anilino-pyrimidines** (pyriméthanol), **hydroxyanilides** (fenhexamid) *(et IDM)*
(moyennement résistantes aux phénylpyrroles (fludioxonil))

N° labo 2013.Anses.	Région	Référence parcelles	date prélèvement	date réception	Date test	analyse sur	% germination / témoin	% de souches							
								ImiR1	AniR1	HydR3	QoI R	CarR	MDR1	MDR2	MDR3
144	BR	13-BR-22-01	06/08/13	20/08/13	24/08/13	Prélèvement sur tomates avec écouvillons	61	0	53	0	0	0	0	0	0
188	CE	13-CE-37-01	23/09/13	26/09/13	30/09/13	Prélèvement sur tomates avec écouvillons	82	63	28	40	27	0	0	0	0
56	IdF	13-IdF-91-01	15/07/13	18/07/13	22/07/13	Prélèvement sur tomates avec écouvillons	80	100	46,5	0	0	0	0	0	0
292	BN	13-BN-14-01	16/10/13	23/10/13	23/10/13	Prélèvement sur tomates avec écouvillons	72	100	49	0	0	0	0	0	0