HAL
open science

Étude in vitro de la résistance de Botrytis cinerea aux fongicides anilinopyrimidines

P Leroux, M Gredt

To cite this version:

P Leroux, M Gredt. Étude in vitro de la résistance de Botrytis cinerea aux fongicides anilinopyrimidines. Agronomie, 1995, 15 (6), pp.367-370. hal-00885692

HAL Id: hal-00885692

https://hal.science/hal-00885692v1

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

agronomie (1995) 15, 367-370
© Elsevier/INRA

Pathologie végétale

Étude *in vitro* de la résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides anilinopyrimidines

P Leroux *, M Gredt

INRA, unité de phytopharmacie et médiateurs chimiques, route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles cedex, France

(Reçu le 22 mai 1995 ; accepté le 27 juillet 1995)

Résumé — Parmi les souches de *Botrytis cinerea* collectées dans des vignobles français en 1993 et 1994, certaines étaient faiblement résistantes au cyprodinil et au pyriméthanil (anilinopyrimidines) ainsi qu'au fenpiclonil (phénylpyrrole). Par ailleurs, une forte résistance aux anilinopyrimidines, non associée à une moindre sensibilité aux phénylpyrroles, a été observée chez quelques souches issues de baies de raisin, ainsi que chez des mutants de laboratoire sélectionnés sur des milieux de culture enrichis en cyprodinil ou en pyriméthanil.

pourriture grise / résistance / anilinopyrimidine / pyriméthanil / fenpiclonil / fongicide / vigne

Summary — *In vitro* study of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea*. *Among the strains of* Botrytis cinerea *collected in various French vineyards during 1993 and 1994, a number exhibited low levels of resistance to cyprodinil, pyrimethanil (anilinopyrimidines) and the phenylpyrrole derivative fenpiclonil. A few field strains and several laboratory mutants selected on cyprodinil or pyrimethanil were highly resistant to these anilinopyrimidines but remained sensitive to phenylpyrroles.*

grey mould / resistance / anilinopyrimidine / pyrimethanil / fenpiclonil / fungicide / vine

INTRODUCTION

Le cyprodinil, le mépanipyrim et le pyriméthanil sont des fongicides systémiques à large spectre d'activité appartenant à la famille des anilinopyrimidines. En France le cyprodinil est autorisé contre le piétin-verse et l'oïdium du blé, il présente également des efficacités intéressantes vis-à-vis de la rhynchosporiose et de l'helminthosporiose de l'orge. Quant au pyriméthanil, il a été introduit pour combattre la pourriture grise sur diverses cultures. La tavelure du pommier constitue également une cible intéressante pour les anilinopyrimidines (Maeno *et al,* 1990 ; Neumann *et al,* 1992 ; Heye *et al,* 1994).

Ces anilinopyrimidines se caractérisent par une activité anti-pénétrante vis-à-vis de nombreux champignons phytopathogènes. Cet effet pourrait résulter de l'inhibition de la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (p ex protéinases, cutinases, cellulases, poly-galacturonases...) nécessaires au processus d'infection (Milling *et al,* 1994 ; Miura *et al,* 1994). Par ailleurs, sur milieux artificiels, l'arrêt de l'élongation des hyphes mycéliens, induite par ces fongicides, résulterait d'une inhibition de la biosynthèse de certains

* Correspondance et tirés à part

acides aminés (Leroux, 1994 ; Masner *et al*, 1994).

La mise sur le marché d'une nouvelle famille de fongicides implique une évaluation du risque de résistance. *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise, qui a déjà développé des résistances à d'autres familles de fongicides (Leroux et Moncomble, 1993), nous a semblé un modèle d'étude intéressant pour les anilinopyrimidines.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des souches de *B cinerea* ont été collectées en septembre 1993 et 1994 sur des baies de raisin, dans divers vignobles français. Leur résistance ou leur sensibilité aux fongicides dicarboximides (par ex iprodione, procymidone, vinchlozoline), benzimidazoles (par ex carbendazime, bénomyl) et phénylcarbamates (par ex diéthofencarbe) sont déterminées selon la méthode de Leroux et Clerjeau (1985). Elles sont maintenues sur un milieu gélosé à base de malt ou de V8, dépourvu de fongicide.

Les matières actives expérimentées sont le cyprodinil et le pyriméthanil (anilinopyrimidines), ainsi que le fenpiclonil, qui appartient aux phénylpyrroles, une nouvelle classe de fongicides anti-*Botrytis* (Leroux et Moncomble, 1993). Elles sont incorporées dans les milieux de culture sous forme de solutions éthanoliques (la teneur finale en éthanol est de 0,5%).

L'effet des fongicides sur la croissance mycélienne de *B cinerea* est étudié selon la méthode de Leroux *et al* (1992). Le milieu de culture renferme 10 g de glucose, 2 g de KH_2PO_4, 1,5 g de K_2HPO_4, 1 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g de $MgSO_4$, $7H_2O$ pour 1 l d'eau désionisée (milieu «MPG»). Les notations journalières des diamètres des plages mycéliennes (incubation 4 j, à 20°C et à l'obscurité) permettent d'estimer les concentrations en fongicide inhibant de 50% (CI50) la vitesse de croissance mycélienne. La présence ou l'absence de développement mycélien au bout de 1 sem permet d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

L'effet des fongicides sur l'élongation des filaments germinatifs issus des conidies de *B cinerea* est étudié selon la méthode de Leroux *et al* (1992). Les essais sont conduits soit sur du milieu «MPG», soit sur du milieu renfermant 10 g de glucose, 2 g de KH_2PO_4, 2 g de K_2HPO_4, pour 1 l d'eau désionisée (milieu «PG»). Après une incubation de 24 h, à 20°C et à l'obscurité, les longueurs des filaments germinatifs sont mesurés sous le microscope et permettent d'estimer les concentrations en fongicide inhibant de 50% (CI50) l'élongation des filaments germinatifs. Au bout de 1 sem, des observations macroscopiques conduisent à l'évaluation des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

RÉSULTATS

En fonction de l'effet du cyprodinil sur l'élongation des filaments germinatifs, il a été possible de classer les souches de *B cinerea* en 3 catégories (tableau I) :

Tableau I. Effet de fongicides sur les spores de diverses souches de *Botrytis cinerea*.

Phénotypes (nombre de souches)	*Cyprodinil*		*Pyriméthanil*		*Fenpiclonil*	
	CI 50	*CMI*	*CI 50*	*CMI*	*CI 50*	*CMI*
Sa (5)	0,02 [0,015-0,025]	0,15 [0,1-0,2]	0,09 [0,08-0,1]	0,4 [0,2-0,5]	0,07 [0,05-0,08]	0,30 [0,2-0,4]
Ra1 (5)	0,15 [0,1-0,2]	0,80 [0,5-1]	0,4 [0,3-0,5]	1,5 [1-2]	0,35 [0,3-0,4]	1,2 [1-1,5]
Ra2 (3)	1,2 [1-1,5]	> 10	3,5 [3-4]	> 10	0,06 [0,05-0,07]	0,25 [0,2–0,3]
Ms-a (5)	4,0 [2-8]	> 10	6,0 [4-10]	> 10	0,06 [0,05-0,08]	0,38 [0,3-0,4]
M1-a (5)	3,0 [2-5]	> 10	5,0 [3-8]	> 10	0,35 [0,3-0,4]	1,2 [1-1,5]

CI 50 : concentrations moyennes en mg/l inhibant de 50% l'élongation des filaments germinatifs sur milieu «PG». CMI : concentrations minimales moyennes en mg/l inhibant le développement de *B cinerea* après inoculation conidienne sur milieu «MPG». Les valeurs extrêmes observées correspondent aux nombres entre crochets.

– les souches les plus nombreuses, collectées ces 2 dernières saisons dans des vignes traitées ou non avec une anilinopyrimidine, considérées comme sensibles (Sa) ont des CI50 comprises entre 0,015 et 0,025 mg/l.

– En 1993 et 1994, sur un total d'environ 600 parcelles (traitées ou non avec une anilinopyrimidine), des souches faiblement résistantes au cypronidil (Ra1) ont été décelées dans 5% des sites échantillonnés. Elles ont des CI50 comprises entre 0,1 et 0,2 mg/l.

– En 1994, dans une parcelle du vignoble bordelais ayant reçu une application de pyriméthanil, des souches fortement résistantes au cyprodinil (Ra2) ont été isolées. Elles ont des CI50 comprises entre 1 et 1,5 mg/l.

Les souches Ra1 présentent une faible résistance vis-à-vis du cyprodinil, du pyriméthanil et du fenpiclonil lorsque les essais sont effectués sur des conidies de *B cinerea* (tableau I). Dans les essais conduits à partir d'implants mycéliens, les souches Sa et Ra1 ont des comportements proche en présence de ces 3 fongicides (tableau II). Au sein de chacun de ces 2 phénotypes, il y a des souches sensibles et résistantes aux dicarboximides, aux benzimidazoles et aux phenylcarbamates (Leroux, non publié).

Quant aux souches Ra2, elles se caractérisent par une forte résistance a cyprodinil et au pyriméthanil dans les essais sur conidies ou sur mycélium. Ces souches Ra2 qui sont résistantes aux dicarboximides, sensibles aux benzimidazoles et résistantes aux phénylcarbamates, réagissent comme celles de type Sa vis-à-vis du fenpiclonil (tableaux I et II).

À partir des souches Sa et Ra1, des secteurs résistants (Ms-a dérivant de Sa et M1-a de Ra-1) au cyprodinil ou au pyriméthanil ont été aisément obtenus à partir d'implants mycéliens incubés 2 sem à des concentrations comprises entre 1 et 5 mg/l. Trois à 4 repiquages mycéliens en présence de fongicide, suivi d'un clonage monoconidien nous ont permis d'obtenir des souches fortement résistantes à ces anilinopyrimidines quel que soit le type d'essais (tableaux I et II). Les secteurs M1-a dérivant des souches Ra1 conservent leur faible résistance aux fenpiclonil dans les essais sur conidies (tableau I). Par ailleurs, les spectres de résistance aux dicarboximides, aux benzimidazoles ou aux phénylcarbamates sont similaires entre les secteurs et les souches parentales.

CONCLUSION

En septembre 1993 et 1994, à partir de baies de raisin pourries collectées dans divers vignobles français, 2 types de souche de *B cinerea* exhibant une sensibilité réduite vis-à-vis des anilinopyrimidines ont été caractérisées.

Tableau II. Effet de fongicides sur la croissance mycélienne de diverses souches de *Botrytis cinerea*.

Phénotypes (nombre de souches	*Cyprodinil*		*Pyriméthanil*		*Fenpiclonil*	
	CI 50	*CMI*	*CI 50*	*CMI*	*CI 50*	*CMI*
Sa (5)	0,01 [0,007-0,02]	0,1 [0,1]	0,07 [0,05-0,1]	0,3 [0,3]	0,01 [0,008-0,03]	0,2 [0,1-0,3]
Ra1 (5)	0,02 [0,01-0,05]	0,3 [0,1-0,5]	0,08 [0,06-0,15]	0,6 [0,3-1]	0,03 [0,02-0,05]	0,6 [0,3-1]
Ra2 (3)	2 [1,5-2,5]	> 10	4 [3-5]	> 10	0,01 [0,008-0,015]	0,2 [0,1-0,3]
MIs-a (5)	> 10	> 10	> 10	> 10	0,01 [0,01-0,02]	–
M1-a (5)	4 [2-10]	> 10	≥ 10	> 10	0,04 [0,02-0,05]	–

CI 50 : concentrations moyennes en mg/l inhibant de 50% la vitesse de croissance mycélienne. CMI : concentrations minimales inhibitrices moyennes en mg/l. Essais réalisés sur milieu «MPG». Les valeurs extrêmes observées correspondent aux nombres entre crochets.

Les plus fréquentes qui présentent une faible résistance au cyprodinil et au pyriméthanil sont également légèrement moins sensibles au fenpiclonil. Cette résistance simultanée aux anilinopyrimidines et aux phénylpyrroles (exprimée essentiellement après inoculation des milieux de culture par des conidies) est inattendue car ces 2 familles de fongicides anti-*Botrytis* possèdent des effets biochimiques différents (Leroux *et al*, 1992 ; Leroux, 1994). Des essais préliminaires *in vivo* semblent indiquer que de telles souches n'ont pas de répercussion sur l'efficacité pratique de ces fongicides (Leroux, non publié).

Quant à la forte résistance aux anilinopyrimidines observée chez quelques souches de *B cinerea* isolées au vignoble ou chez des mutants sélectionnés au laboratoire, elle n'est pas corrélée avec une moindre sensibilité vis-à-vis des phénylpyrroles. En France de telles souches (du fait de leur rareté) n'ont pas entraîné de baisse d'efficacité des anilinopyrimidines, alors qu'en Suisse la résistance en pratique a été décelée dans un essai pluriannuel (Forster et Schuepp, com pers). Face à ce risque, la recommandation actuelle de n'appliquer les anilionopyrimidines qu'une fois par saison est probablement susceptible de réduire la pression sélective de ces fongicides. Par ailleurs, une surveillance des populations de *B cinerea* s'impose. Au vu de nos résultats et, dans nos conditions expérimentales, des concentrations discriminantes de 1 à 2 mg/l pour le cyprodinil ou de 2 à 4 mg/l pour le pyriméthanil pourraient être utilisées pour estimer les fréquences des souches fortement résistantes aux anilinopyrimidines.

RÉFÉRENCES

Heye UJ, Speich J, Siegel H, Steinemann A, Forster B, Knauf-Beiter G, Herzog J, Hubele A (1994) CGA 219417 a novel broad-spectrum fungicide. *Crop Prot* 13, 541-549

Leroux P (1994) Influence du pH, d'acides aminés et de diverses substances organiques sur la fongitoxicité du pyriméthanil, du glufosinate, du captafol du cymoxanil et du fenpiclonil vis-à-vis de souches de *Botrytis cinerea*. *agronomie* 14, 541-554

Leroux P, Clerjeau M (1985) Resistance of *Botrytis cinerea* and *Plasmapora viticola* to fungicides in French vineyards. *Crop Prot* 4, 137-160

Leroux P, Moncomble D (1993) Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne : passé, présent, futur. *Phytoma* 450, 27-30 et 451, 23-37

Leroux P, Lanen C, Fritz R (1992) Similarities in the antifungal activities of fenpiclonil, ipridione and tolclofos-methyl against *Botrytis cinerea* and *Fusarium nivale*. *Pestic Sci* 36, 255-261

Maeno S, Miura I, Masuda K, Nagata T (1990) Mepanipyrim (KIF-3535), a new pyrimidine fungicide. *Brighton Crop Prot Conf Pests Dis* 415-422

Masner P, Muster P, Schmid J (1994) Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides. *Pestic Sci* 42, 162-166

Milling RJ, Richardson CJ, Pilmoor JB (1994) The biochemical mode of action of pyrimethanil. *8th IUPAC Internat Congr Pesticide Chemistry,* Washington, DC, Poster 432

Miura I, Kamakura T, Maeno S, Hayashi S, Yamagushi I (1994) Inhibition of enzyme secretion in plant pathogens by mepanipyrim, a novel fungicide. *Pestic Biochem Physiol* 48, 222-228

Neumann GL, Winter EH, Pittis JE (1992) Pyrimethanil, a new fungicide. *Brighton Crop Prot Conf Pests Dis* 395-402