

Sensibilité initiale de la septoriose du blé aux fongicides SDHI (carboxamides)

Stéphanie Schürch¹ et Thibaut Cordette²

¹Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon, Suisse

²Université de Picardie Jules Vernes, 80000 Amiens, France

Renseignements: Stéphanie Schürch, e-mail: stephanie.schuerch@acw.admin.ch, tél. +41 22 363 43 75



En Suisse, la moitié des céréales panifiables sont protégées contre les maladies foliaires par une application de fongicide.

Introduction

La septoriose est une des plus importantes maladies fongiques du blé sous nos latitudes. La gestion de cette maladie est basée sur la culture de variétés peu sensibles, sur le travail du sol et sur l'application de fongicides. En Suisse, la moitié de la surface dédiée aux céréales panifiables est cultivée en mode conventionnel et est donc protégée contre les maladies foliaires par pulvérisation d'un produit fongicide. L'un des agents pathogènes de

la septoriose est *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt., aussi connu sous le nom de sa forme asexuée, *Septoria tritici* Rob. in Desm. Jusqu'à récemment, deux groupes de matières actives étaient utilisés pour lutter contre cette maladie: les QoI (*Quinone Outside Inhibitors*; strobilurines) et les DMI (*Demethylation Inhibitors*; dont les triazoles). Une mutation ponctuelle conférant la résistance aux QoI est rapidement apparue dans les populations de *M. graminicola*, rendant l'efficacité de ce groupe aléatoire. Le pathogène s'est aussi adapté

aux DMI par une perte de sensibilité graduelle, ce qui peut se traduire au champ par une érosion de l'efficacité des produits. Pour gérer ces phénomènes de résistance, le chlorothalonil, une matière active multi-sites, est régulièrement utilisé comme partenaire de mélange. Dès 2010, des fongicides à base de SDHI (*Succinate Dehydrogenase Inhibitors*) sont apparus sur le marché pour lutter contre la septoriose. Les SDHI, aussi appelés carboxamides, sont en fait une ancienne famille de fongicides utilisés depuis les années 1970 pour traiter les semences contre les Basidiomycètes (agents du charbon ou de la carie, par exemple; Rheinheimer 2012). La plus ancienne molécule de cette famille encore utilisée aujourd'hui est la carboxine, mise sur le marché en 1968.

La découverte du boscalid en 2003 a donné un nouvel élan à cette famille puisque cette molécule est aussi active contre les Ascomycètes. Cet élargissement du spectre d'activité a rendu possible l'utilisation des SDHI contre les maladies foliaires des céréales. Ceci a suscité un regain d'intérêt consécutif des firmes phytopharmaceutiques pour cette famille et conduit au développement de nouvelles molécules, comme l'isopyrazam ou le bixafen. Vu le développement de résistances aux Qol et DMI, disposer d'un nouvel outil pour lutter contre la septoriose est intéressant. A ce jour, aucune souche de *M. graminicola* résistante aux carboxamides n'a été détectée en champ (FRAC 2012), mais des mutants résistants ont pu être obtenus en laboratoire (Skinner *et al.* 1998; Fraaije *et al.* 2012). De plus, des souches résistantes ont été trouvées au champ pour plusieurs autres pathogènes comme *Botrytis cinerea* ou *Sclerotinia sclerotiorum* (FRAC 2012).

Les carboxamides inhibent au niveau des mitochondries un enzyme de la chaîne respiratoire (complexe II); un maillon indispensable de la production d'énergie dans les cellules fongiques. Chez les souches résistantes, cet enzyme est légèrement modifié (substitution d'un ou plusieurs acides aminés) de façon à ce que la molécule fongicide ne puisse plus se lier correctement à son site d'action. Le risque de développement de résistance chez *M. graminicola* vis-à-vis des SDHI est estimé moyen à élevé. Pour suivre l'évolution de la résistance chez ce pathogène, la sensibilité initiale (ligne de base) doit être connue. Ce point de départ est important pour évaluer l'efficacité des mesures de gestion de la résistance.

Le but de la présente étude était de mettre au point dans notre laboratoire un test de sensibilité à grande échelle et de définir la ligne de base pour trois molécules appartenant aux SDHI: le boscalid, le bixafen et l'isopyrazam. Si, à l'avenir, une analyse de la résistance s'avérait nécessaire suite à d'éventuels doutes sur l'efficacité de ces molécules, un point de comparaison est disponible.

Résumé

Une nouvelle famille de fongicides, les carboxamides (ou SDHI), est disponible depuis peu pour lutter contre la septoriose du blé. Le risque de développement de résistances chez *Mycosphaerella graminicola* vis-à-vis de cette famille est estimé moyen à élevé. Des précautions d'utilisation sont donc nécessaires pour conserver le plus longtemps possible l'efficacité des carboxamides. Un suivi de la résistance pourrait être nécessaire si l'efficacité au champ n'est plus satisfaisante. Dans ce but, un protocole a été établi pour tester la sensibilité des souches à grande échelle. La sensibilité initiale de 117 souches de ce pathogène vis-à-vis de trois matières actives de la famille des SDHI a été évaluée *in vitro*. Ces données forment une «ligne de base» et pourront au besoin servir de point de comparaison. Dans un premier temps, pour prévenir et freiner le développement des résistances, les carboxamides ne sont appliquées sur céréales qu'une fois par culture et ne sont utilisées qu'en mélange avec des matières actives appartenant à un autre groupe de résistance.

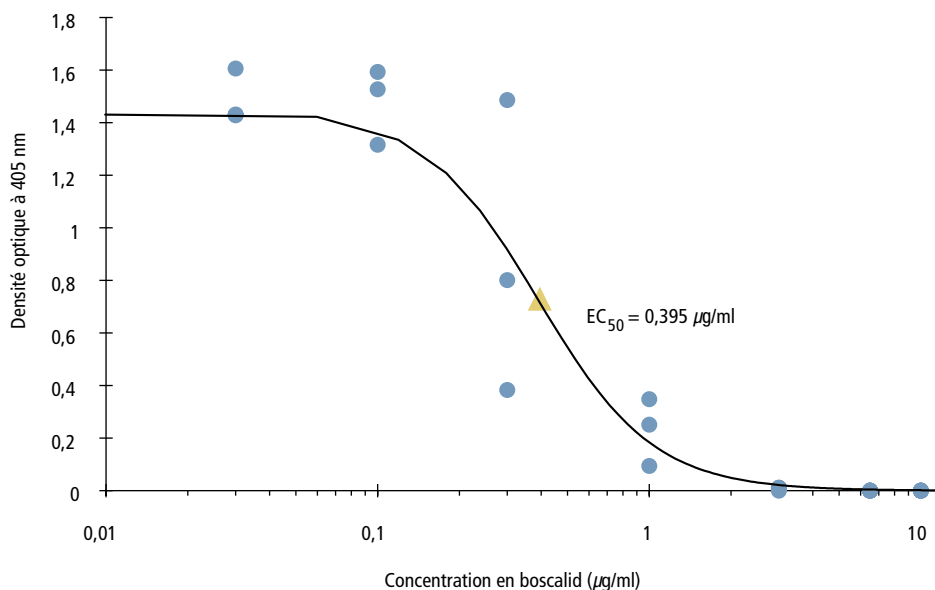


Figure 1 | Croissance de *Mycosphaerella graminicola* (souche 11-02) à sept concentrations de boscalid (ronds bleus) et EC_{50} (triangle jaune), calculée par régression logistique (modèle = ligne noire).

Matériel et méthodes

Un total de 127 souches de *M. graminicola* ont été isolées à partir de lésions foliaires. En 2008, le matériel végétal (variété Arina) provenait de Changins (VD) et Goumoëns-la-Ville (VD); en 2011, de ces deux mêmes lieux (variétés Arina et Tapidor) ainsi que de Satigny (variétés Zinal et Levis). Pour les tests de sensibilité (méthodologie d'après G. Stammler BASF, modifiée), les souches ont été incubées 7 jours sur yeast-malt-agar (YMA: 4 g d'extrait de levure, 4 g d'extrait de malt, 4 g de saccharose, 15 g d'agar, dans 1 l d'eau bidistillée, 50 mg d'auréomycine). La croissance levuriforme a été encouragée par exposition aux UV proches. Des spores prélevées à l'aide d'un coton-tige ont été mises en suspension dans un milieu liquide yeast-bacto-glycerol doublement concentré (YBG: 20 g d'extrait de levure, 20 g de bacto peptone, 40 ml de glycérol dans 1 l d'eau bidistillée). La concentration des spores a été ajustée à $1,6 \times 10^4$ spores/ml.

Chacune des trois matières actives (Fluka) a été dissoute dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour obtenir une solution mère à 1 g/l. Les concentrations finales des substances actives étaient de 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 6,5 et

10 µg/ml avec une concentration constante de DMSO à 1%. Dans des plaques de microtitration 96 puits, 50 µl de suspension de spores ont été mises en contact avec 50 µl de solution fongicide. Chaque test comportait un témoin négatif (milieu YBG sans spores) et a été répété trois fois. Après 7 jours d'incubation à 18 °C dans l'obscurité et sous agitation constante, la croissance a été évaluée par mesure de l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (MRX Reader, Dynex technologies). La sensibilité aux fongicides a été définie par la quantité de substance inhibant la croissance de 50% (EC_{50}), elle-même déterminée par une régression logistique à quatre paramètres (fig. 1) effectuée avec XLSTAT (Version 2011.2.04, Addinsoft 1995–2011).

Résultats

La méthodologie a été adaptée afin d'obtenir des résultats fiables et reproductibles. Les tests de sensibilité ont été effectués en plaques de microtitration ce qui a rendu possible l'étude d'un relativement grand nombre (117) de souches de *M. graminicola*. Une plus grande quantité de boscalid était nécessaire pour inhiber la croissance de 50% (EC_{50} entre 0,093 et 0,919 µg/ml, moyenne 0,388 µg/

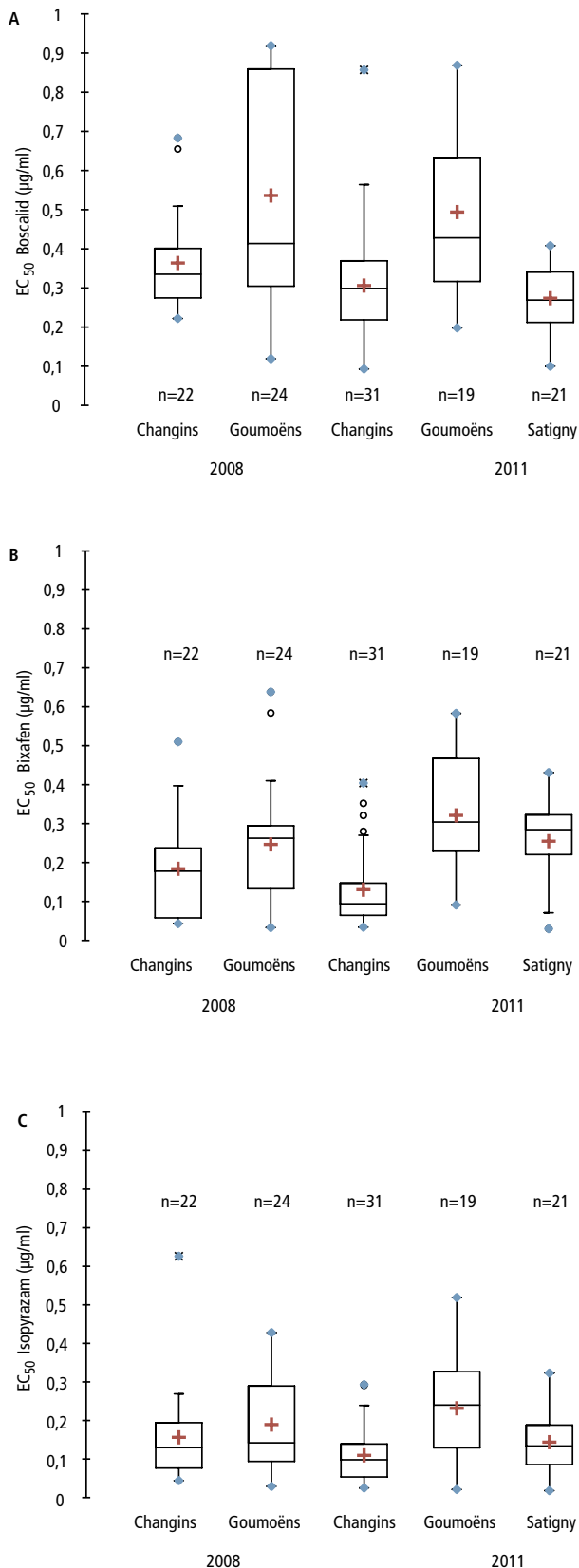


Figure 2 | Sensibilité de cinq populations de *M. graminicola* au (A) boscalid, (B) bixafen et (C) isopyrazam. (Boîtes à moustaches: 50 % des données dans le rectangle, ligne horizontale = médiane, croix rouge = moyenne).

ml) par rapport aux deux autres matières actives (Kruskal–Wallis $K = 98,3$, $P < 0,0001$; fig. 2). Le bixafen (EC_{50} entre 0,030 et 0,638 µg/ml, moyenne 0,217 µg/ml) était un peu moins efficace *in vitro* que l'isopyrazam (EC_{50} entre 0,018 et 0,626 µg/ml, moyenne 0,161 µg/ml). Il n'y avait pas de différence significative entre les deux années de prélèvement, 2008 et 2011. La résistance aux strobilurines des 46 souches collectées en 2008 était préalablement connue. Les souches résistantes et les souches sensibles aux strobilurines ne présentaient pas de profil de sensibilité aux carboxamides significativement différent. Entre carboxamides, par contre, la sensibilité était corrélée. La sensibilité au bixafen était liée le plus fortement à celle à l'isopyrazam ($R^2 = 0,47$, $P < 0,0001$; fig. 3), alors que la corrélation entre boscalid et isopyrazam ($R^2 = 0,31$, $P < 0,0001$) était un peu moins forte et celle entre bixafen et boscalid ($R^2 = 0,17$, $P < 0,0001$) la plus faible.

Discussion

Un protocole adapté à notre laboratoire et la sensibilité initiale aux carboxamides de souches suisses de *M. graminicola* ont été établis. Cette ligne de base est un point de comparaison indispensable à toute étude de sensibilité future. La fourchette de concentration de fongicide utilisée était adaptée à la sensibilité de la population. L'ajout de deux concentrations supplémentaires entre 0,1 et 1 µg/ml permettrait une estimation plus précise des EC_{50} . Réunir les conditions induisant une croissance levuriforme et homogène (conditions indispensables à une mesure quantitative) de *M. graminicola* dans des puits de 6,5 mm de diamètre est relativement délicat.

Les EC_{50} obtenues (moyennes et fourchettes) correspondent à celles décrites pour des souches de *M. graminicola* d'autres provenances (Sierotzki *et al.* 2010; Fraaije *et al.* 2012). Les fourchettes sont relativement larges. Une plus grande quantité de boscalid que de bixafen ou d'isopyrazam est nécessaire pour inhiber la croissance des souches. Selon un modèle structural des interactions entre les carboxamides et leur cible, l'affinité (force de liaison) du boscalid avec les protéines du complexe II serait inférieure à celles des deux autres molécules (Fraaije *et al.* 2012). Nous n'avons pas observé de résistance croisée entre les strobilurines et les carboxamides; deux familles de fongicides ayant un mode d'action différent. Par contre, la sensibilité aux carboxamides était intercorrélée, ce qui s'explique facilement vu que les trois molécules ont la même cible et le même mode d'action. On parle de sensibilité croisée. Pratiquement, cela signifie que si une souche venait à développer une résistance à une molécule, elle serait aussi résistante aux deux autres.

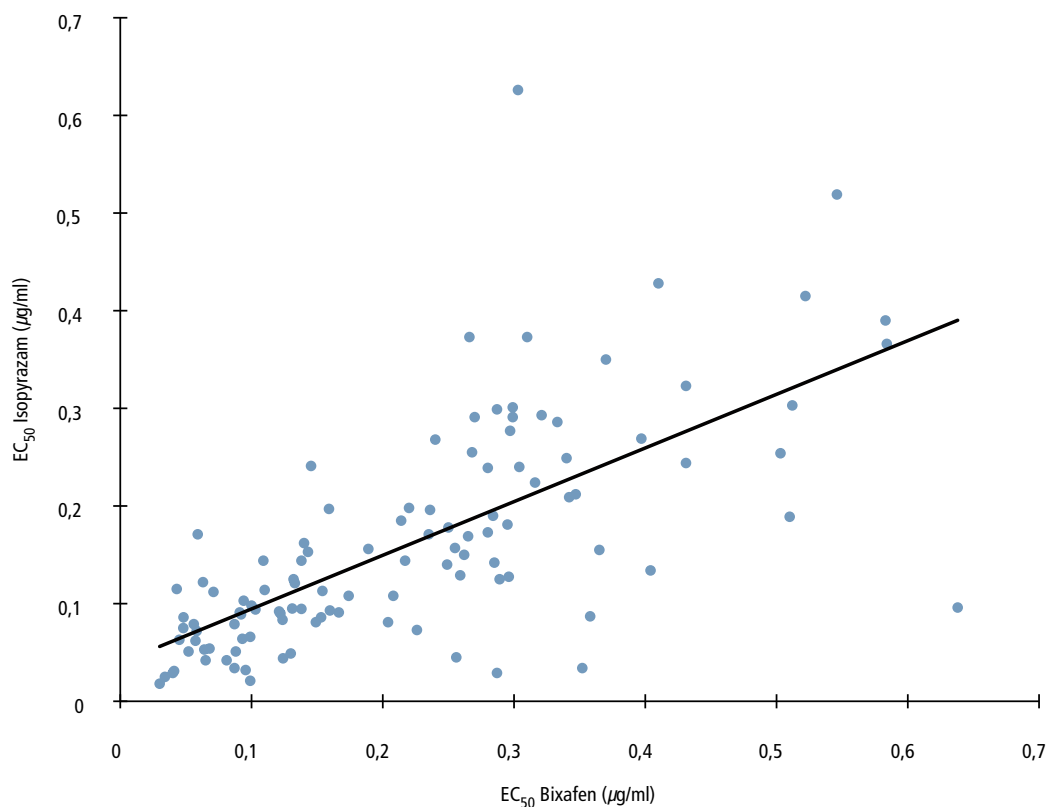


Figure 3 | Sensibilité croisée entre bixafen et isopyrazam chez *M. graminicola* (régression linéaire $y = 0,55x + 0,04$; $n = 111$).

Des mesures ont été prises pour limiter le risque de développement de résistance dans les populations naturelles de *M. graminicola*. Les carboxamides ne sont pas employées seules pour lutter contre la septoriose, mais en mélange avec des triazoles qui ont un mode d'action différent et avec lesquelles il n'y a pas de résistance croisée. L'application est limitée à un seul traitement contre les maladies foliaires sur céréales. Ces deux mesures devraient être suffisantes pour limiter le risque de prolifération des souches résistantes et conserver à long terme l'efficacité des carboxamides. ■

Riassunto**Sensibilità iniziale ai fungicidi SDHI (carbrossamidici) della septoriosi del frumento**

E' da poco disponibile una nuova famiglia di fungicidi, i carbrossamidici o SDHI per lottare contro la septoriosi del frumento. Il rischio di sviluppare delle resistenze nella *Mycosphaerella graminicola* verso questa famiglia è stimato da medio a elevato. E' dunque necessario prendere delle precauzioni nell'uso per conservare il più lungo possibile l'efficacia dei carbrossamidici. Un monitoraggio delle resistenze potrebbe essere necessario se l'efficacia in campo non è più soddisfacente. A questo scopo è stato stabilito un protocollo per testare su larga scala la sensibilità dei ceppi. La sensibilità iniziale di 117 ceppi di questo patogeno verso tre sostanze attive della famiglia dei SDHI è stata valutata *in vitro*. Questi dati formano una «linea di base» e potrebbero, al bisogno, servire come punto di confronto. Per prevenire e frenare, in un primo tempo, lo sviluppo di resistenze, i carbrossamidici sono applicati su cereali solo una volta per coltura e sono utilizzati unicamente miscelati con delle sostanze attive appartenenti a un altro gruppo di resistenza.

Summary**Baseline sensitivity of septoria leaf blotch to SDHI fungicides**

Since recently, a new class of fungicides is available to control Septoria leaf blotch of wheat, the so-called carboxamides or SDHI. The risk of resistance development in *Mycosphaerella graminicola* to SDHI fungicides is estimated to be medium to high. Therefore the implementation of an anti-resistance strategy is necessary to preserve the efficacy of these fungicides. Sensitivity studies may be necessary in case field efficacy weakens. Thus, a method was established to conduct large-scale sensitivity tests in our laboratory. The sensitivity to three SDHI active substances (boscalid, bixafen and isopyrazam) of 117 Swiss *M. graminicola* strains was measured *in vitro*. These data describe the «baseline sensitivity» (initial sensitivity level prior to the introduction of the fungicides) and may be used in case of control failures to detect potential shifts in sensitivity. At the moment, to prevent resistance emergence and build up, SDHI fungicides are applied on cereals only once per crop and are used only in mixtures with partners having a different mode of action.

Key words: EC₅₀, baseline sensitivity, resistance, septoria leaf blotch, wheat.

Bibliographie

- Fraaije B. A., Bayon C., Atkins S., Cools H. J., Lucas J. A. & Fraaije M. W., 2012. Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control Septoria leaf blotch in wheat. *Molecular Plant Pathology* **13** (3), 263–275.
- FRAC, 2012. Succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) working group. Minutes of the 5th meeting on December 6, 2011. Accès: <http://www.frac.info> [6 novembre 2012].
- Rheinheimer J., 2012. Succinate dehydrogenase inhibitors: anilides. In: Modern crop protection compounds (éd. W. Krämer, U. Schirmer, P. Jeschke & M. Witschel). Wiley, *Weinheim*, 627-639.
- Sierotzki H., Frey R., Morchoisne M., Olaya G., Mösch M. & Scalliet G., 2010. Sensitivity of fungal pathogens to SDHI fungicides. In: Modern fungicides and antifungal compounds VI (éd. H. W. Dehne, H. B. Deising, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russel & H. Lyr). DPG, Braunschweig, 179–186.
- Skinner T., Bailey A., Renwick A., Keon J., Gurr S. & Hargreaves J. A., 1998. A single aminoacid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* **34** (5), 393–398.