

AFPP – 23^e CONFÉRENCE DU COLUMA
JOURNÉES INTERNATIONALES SUR LA LUTTE CONTRE LES MAUVAISES HERBES
DIJON – 6, 7 ET 8 DÉCEMBRE 2016

**RESISTANCE AUX INHIBITEURS DE L'ALS CHEZ LE SENEÇON COMMUN (*SENECIO VULGARIS*) : LA
SITUATION EN VIGNE ET EN GRANDES CULTURES**

S. MICHEL⁽¹⁾ ET C. DELYE⁽¹⁾

⁽¹⁾ INRA, AGROÉCOLOGIE, 17 RUE SULLY, F-21000 DIJON, FRANCE, delye@dijon.inra.fr

RÉSUMÉ

Le Séneçon commun (*Senecio vulgaris*) est une espèce ubiquiste, très mobile et dont les semences peuvent lever pratiquement toute l'année. C'est aussi à ce jour la seule espèce adventice en France à avoir officiellement évolué une résistance à un même mode d'action herbicide à la fois en vigne et en grandes cultures. L'objet de cette communication est de faire le point sur quelques aspects majeurs de cette résistance : mécanismes en cause, diagnostic, viabilité des semences, propagation et étendue de la résistance.

Mots-clés : Séneçon, résistance, herbicides inhibiteurs de l'ALS, vigne, grandes cultures.

ABSTRACT

**RESISTANCE TO ALS-INHIBITING HERBICIDES IN COMMON GROUNDSEL (*SENECIO VULGARIS*):
SITUATION IN FRENCH VINEYARDS AND MAJOR FIELD CROPS**

Common groundsel (*Senecio vulgaris*) is a ubiquitous weed that is highly mobile and which seeds can germinate almost all year long. It also is the only weed species today in France that is officially acknowledged to have evolved a resistance to one same herbicide mode of action both in vineyards and major field crops. The purpose of this paper is to provide a picture of a few major aspects of this resistance: underlying mechanisms, detection, seed viability, spread and geographical extent of the resistance.

Keywords: Groundsel, resistance, ALS-inhibiting herbicides, grapevine, field crops.

INTRODUCTION

Le séneçon commun (*Senecio vulgaris* L., Asteraceae) est une espèce tétraploïde, dicotylédone et auto-fertile (revu par Robinson *et al*, 2003). *S. vulgaris* a un cycle de vie très court qui peut être terminé dans les 18 à 100 jours de graine à graine, en fonction de l'environnement. En conséquence, *S. vulgaris* peut se développer toute l'année en Europe. Il peut donc effectuer plusieurs générations consécutives par an et des cohortes chevauchantes peuvent être présentes dans le champ. En cela, *S. vulgaris* est une mauvaise herbe inhabituelle, parce que beaucoup de mauvaises herbes sont annuelle avec un seul cycle de reproduction par an. Ceci, ajouté à sa très forte capacité de dissémination *via* des semences anémochores, zoochores et transportées par la machinerie agricole, font que cette mauvaise herbe a un comportement « épidémiologique » proche de celui d'une maladie fongique aérienne. Le contrôle chimique de *S. vulgaris* est donc difficile, et cette situation peut encore empirer en cas d'évolution de résistance à des herbicides.

En France, *S. vulgaris* a évolué depuis le milieu des années 2000 une résistance aux herbicides inhibiteurs de l'ALS qui concerne à la fois la vigne et les grandes cultures (Délye *et al*, 2015). L'objet de cette communication est de faire le point sur la situation de la résistance chez *S. vulgaris* : nature (mécanismes), étendue géographique, possibilité de propagation, tests de détection.

MATERIELS ET MÉTHODES

MECANISMES DE RESISTANCE

Tests biologiques de sensibilité aux inhibiteurs d'ALS

Les graines de *S. vulgaris* sont attachés à une structure en panache appelée *pappus* qui facilite la dispersion. Les graines ont été détachés manuellement et séparés en les frottant les *pappi* deux fois à travers un tamis ayant des ouvertures de 0,8 mm. Des semences propres de 3 populations où la résistance est présente (22-Bou, 22-Erq, 33-Sau, Délye *et al*, 2015) et d'une population de référence contenant 100% de plantes sensibles (21-Dij) ont été placés dans des boîtes de Pétri sur du papier buvard imbibé d'une solution de KNO₃ (20 mM) et mises à germer pendant une semaine dans des chambres à environnement contrôlé (22 ° C, lumière 14h). Des graines germées au stade cotylédon ont ensuite été plantées dans des plateaux en plastique (volume de 1 litre, 17 × 12,5 × 5,5 cm de dimensions) remplie d'un mélange commercial substrat / perlite (70/30 vol / vol) et éclaircies à 16 par plateau deux jours avant l'application d'herbicides.

Les herbicides suivants ont été appliqués aux doses maximales autorisées en 2015 en utilisant des formulations commerciales: flazasulfuron (sulfonylurée, dose maximale autorisée en vigne = 50 g.ha⁻¹, appliqué comme Katana, ISK BioSciences, 25% p/p flazasulfuron), metsulfuron (sulfonylurée, dose maximale autorisée en grandes cultures = 6 g.ha⁻¹, appliqué comme Allié SX, DuPont, 20% p/p metsulfuron), iodosulfuron + mésosulfuron (sulfonylurées, dose maximale autorisée en grandes cultures = 7,5 + 7,5 g.ha⁻¹, appliqué comme Archipel, Bayer CropScience, 3% p/p iodosulfuron + 3% p/p mésosulfuron), prosulfuron (sulfonylurée, dose maximale autorisée en grandes cultures = 15 g.ha⁻¹, appliqué comme Peak, Syngenta Agro, 75% p/p prosulfuron), imazamox (imidazolinone, dose maximale autorisée en grandes cultures = 50 g.ha⁻¹, appliqué comme Pulsar 40, BASF, 40 g.L⁻¹ imazamox), florasulam (triazolopyrimidine, dose maximale autorisée en grandes cultures = 7,5 g.ha⁻¹, appliqué comme Primus, Dow AgroSciences, 50 g.L⁻¹ florasulam). Chaque herbicide a été utilisé dans des expériences de dose-réponse, y compris les modalités expérimentales suivantes: non traitée, 0,5,

1, 2 et 5 fois la dose maximale autorisée de l'herbicide testé. Trois plateaux (à savoir, 48 plantes) ont été utilisés par dose d'herbicide et par population. Chaque expérience dose-réponse a été répétée. Les herbicides ont été appliqués lorsque les plantes ont atteint le stade 3-4 feuilles vraies, sauf pour le flazasulfuron qui a été appliqué au stade 2 feuilles vraies, conformément à la recommandation du fabricant. Les herbicides ont été appliqués à l'aide d'un pulvérisateur mono-buse (buse 110-04, Albus, France) dans 300 litres.ha⁻¹ l'eau à 400 kPa, à une vitesse de 6,6 km.h⁻¹. Les phénotypes des plantes individuelles ont été évalués visuellement deux semaines après l'application de l'herbicide, lorsque les plantes de la population de référence 21-Dij étaient clairement mortes. Les plantes qui ne sont pas affectées par l'application d'herbicides ont été notés R (entièrement résistant), les plantes modérément touchées par l'application d'herbicides, mais saines et émettant de nouvelles feuilles vertes ont été notées r (moyennement résistant), les plantes gravement touchées par l'application d'herbicides, mais émettant encore de nouvelles feuilles vertes vivantes ont été notés s (modérément sensibles) et les mortes ont été notés S (sensibles).

Génotypage et séquençage de l'ALS

Le Séneçon possède deux ALS (ALS1 et ALS2). Des amorces spécifiques de chaque ALS (Délye *et al* 2016) sont utilisées pour le séquençage intégral de l'ALS1 ou de l'ALS2 dans une plante donnée, afin de rechercher des mutations en cause dans la résistance.

Suite aux résultats du séquençage, trois tests dérivés de la PCR basés sur la technique de dCAPS (derived Clived Amplified Polymorphic Sequence, Neff *et al*, 1998) ciblant le codon 197 de respectivement l'ALS1, l'ALS2 ou des deux ALS ont été développés pour le génotypage de mutations de l'ALS en cause dans la résistance. Le détail des tests est décrit par ailleurs (Délye *et al*, 2016).

PROPAGATION DE LA RESISTANCE

Afin d'identifier les plantes de Séneçon portant un ou des allèles mutant(s) de l'ALS, une feuille a été prélevée sur 50 plantes dans chacun de 33 champs sélectionnés aléatoirement situés de 0,2 à 14,5 km d'un foyer initial de résistance contenant la mutation Leu197 de l'ALS1 situé en Bretagne. Les feuilles ont été recueillies de février à mai 2014. En février 2015, un second échantillonnage a été effectué sur une zone plus large dans 68 champs supplémentaires situés de 1,6 à 75 km du foyer. Après la collecte, les feuilles ont été enveloppées dans des serviettes en papier et envoyées par la poste à notre laboratoire où elles ont été stockées à -20 ° C avant l'extraction de l'ADN et le génotypage de l'ALS. Toutes les plantes ont été génotypées au codon 197 de l'ALS1 et de l'ALS2.

CARTOGRAPHIE DE LA RESISTANCE

Outre les populations utilisées dans la section précédente, 37 populations supplémentaires collectées dans divers vignobles ont été analysées. Ces populations comprennent notamment 22 populations collectées aléatoirement selon un transect nord-sud de 111 km entre Lyon et Châlon sur Saône. Dans chaque population, 50 plantes ont été collectées et génotypées au codon 197 de l'ALS1 et de l'ALS2.

RESULTATS

MECANISMES DE RESISTANCE

Tests biologiques de sensibilité aux inhibiteurs d'ALS

Pour chacun des herbicides considérés, les résultats des deux réplicats de dose-réponse sont pas différents (test d'hétéroscédasticité au seuil de 5%) et ont été rassemblées pour l'analyse. Dans

toutes les expériences, toutes les plantes témoins non traités ont montré une croissance similaire pour les 4 populations de *S. vulgaris* étudiés (illustré sur la Figure 1).



Figure 1. Variation phénotypique entre plantes de *S. vulgaris* de la population 22-Bou (100% de plantes homozygote mutantes Leu197 sur l'ALS1) observée 2 semaines après l'application de 2 fois la dose maximale autorisée d'iodosulfuron + mésosulfuron. À droite, témoin non traité. À gauche, plantes traitées. La note phénotypique est indiquée à côté de chaque plante (R : résistant, r : modérément résistant ; s : modérément sensible ; S : sensible). Quelques plantes notées S ne sont plus visibles car ayant pourri rapidement après leur mort.

Figure 1. Phenotype variation among *S. vulgaris* plants from population 22-Bou (100% homozygous mutant plants carrying two Leu197 ALS1 alleles) observed two weeks after application of twice the field rate of iodosulfuron+mesosulfuron. Right, untreated control; left, treated plants. The phenotype rating attributed to each treated plant is given in yellow. R, fully resistant; r, moderately resistant; s, moderately sensitive; S, sensitive (dead). Some plants rated S that died very rapidly after herbicide application decayed and are no longer visible on the picture.

Dans chaque expérience, les trois lots de 16 plantes de la population de référence Dij-21 utilisées comme référence sensible pour vérifier l'efficacité des herbicides ont été notés S (sensible) à la dose maximale autorisée (N) de 4 des herbicides utilisés (iodosulfuron + mésosulfuron, metsulfuron, tribénuron, flazasulfuron, florasulam) et S ou r- (faiblement résistant) à la dose maximale autorisée des deux autres herbicides (Figure 2).

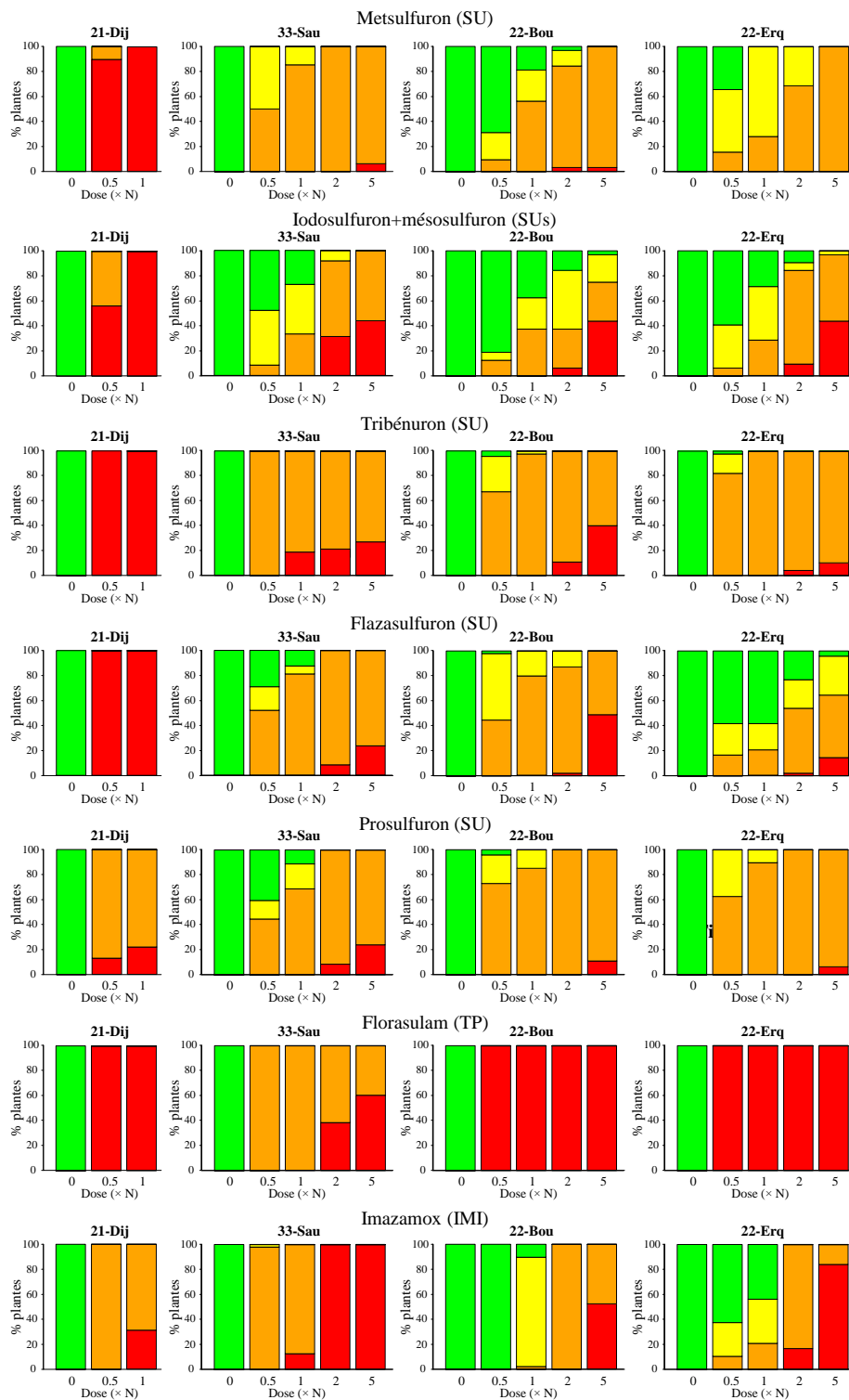


Figure 2. Distribution des phénotypes obtenus avec 7 inhibiteurs de l'ALS dans 4 populations de *S. vulgaris* (33-Sau, 22-Bou, 22-Erq : 100% de plants homozygotes mutants et la population de référence 21-Dij). Le % de plantes avec un phénotype donné est représenté par la section verte (R), jaunes (r), orange (s) ou rouge (S) des graphes.

Figure 2. Distribution of the phenotype ratings obtained with 7 ALS inhibitors in four *S. vulgaris* populations (33-Sau, 22-Bou, 22-Erq: 100% homozygous mutant plants, and the reference population 21-Dij). The % of plants that was assigned a given phenotypic rating in each population at a given herbicide rate is represented by the green (R), yellow (r), orange (s) or red (S) section of the barplots.

Les populations 22-Bou, 22-Erq contenaient 100% de plantes homozygotes mutantes Leu197 à l'ALS1. La population 33-Sau contenait 100% de plantes homozygotes mutantes Ser197 à l'ALS1. Aucune autre mutation n'était présente sur l'ALS1 ou l'ALS2. Malgré des génotypes à l'ALS identiques pour toutes les plantes dans une population donnée, des variations du phénotype ont été observées dans la plupart des modalités traitées pour chaque population (Figure 2, illustré sur la Figure 1). Dans l'ensemble, une nette évolution vers une diminution de la sensibilité a été observée avec la plupart des herbicides pour les plantes dans les populations 22-Bou, 22-Erq et 33-Sau par rapport aux plantes dans la population de référence 21-Dij (Figure 2). Dans les trois populations en question, on n'a observé aucune plante S à la dose maximale autorisée de metsulfuron, iodosulfuron + mésosulfuron, flazasulfuron, prosulfuron. Dans l'ensemble, et alors que les génotypes à l'ALS des plantes dans ces deux populations sont identiques, les plantes dans la population de 22 Bou ont montré une diminution plus prononcée de la sensibilité au metsulfuron que les plantes dans la population de 22 Erq, tandis que les plantes dans la population de 22-Erq ont montré une diminution plus prononcée de la sensibilité à l'imazamox et flazasulfuron que les plantes dans la population 22-Bou (Figure 2).

PROPAGATION DE LA RESISTANCE

50 plantes ont été génotypées à l'ALS1 dans chacune des 33 populations échantillonnées en 2014 et dans chacune des 68 populations échantillonnées en 2015. L'allèle mutant Leu197 de l'ALS1 présent dans le foyer originel a été détecté dans 31 des 33 populations recueillies en 2014, jusqu'à une distance de 14 km du foyer (Figure 4). Dans ces 33 populations, la fréquence des plantes portant l'allèle mutant Leu197 d'ALS1 varie de 2,2 à 100,0%. De même, l'allèle mutant Leu197 d'ALS1 a été détecté dans 48 des 68 populations recueillies en 2015, jusqu'à une distance de 62 km du foyer (Figure 4). Dans ces 48 populations, la fréquence des plantes portant l'allèle mutant Leu197 d'ALS1 variait de 2,2 à 97,8%.



Figure 4. Zone où un même allèle mutant de l'ALS a été détecté chez *S. vulgaris* (surlignée en rouge). L'étoile indique le foyer d'origine probable de l'allèle mutant.

Figure 4. Area where one same mutant ALS allele has been detected in *S. vulgaris* (highlighted in red). The star indicates the likely origin of the mutant allele.

CARTOGRAPHIE DE LA RESISTANCE

L'analyse de 138 populations de Sénéçon a permis d'identifier des plantes mutantes à l'ALS dans 113 des 138 populations analysées (pour rappel, 101 en grandes cultures et 37 en vigne). Ceci a permis

d'établir une cartographie (**non exhaustive**) de la présence de résistance aux herbicides inhibiteurs de l'ALS chez cette espèce (Figure 5).

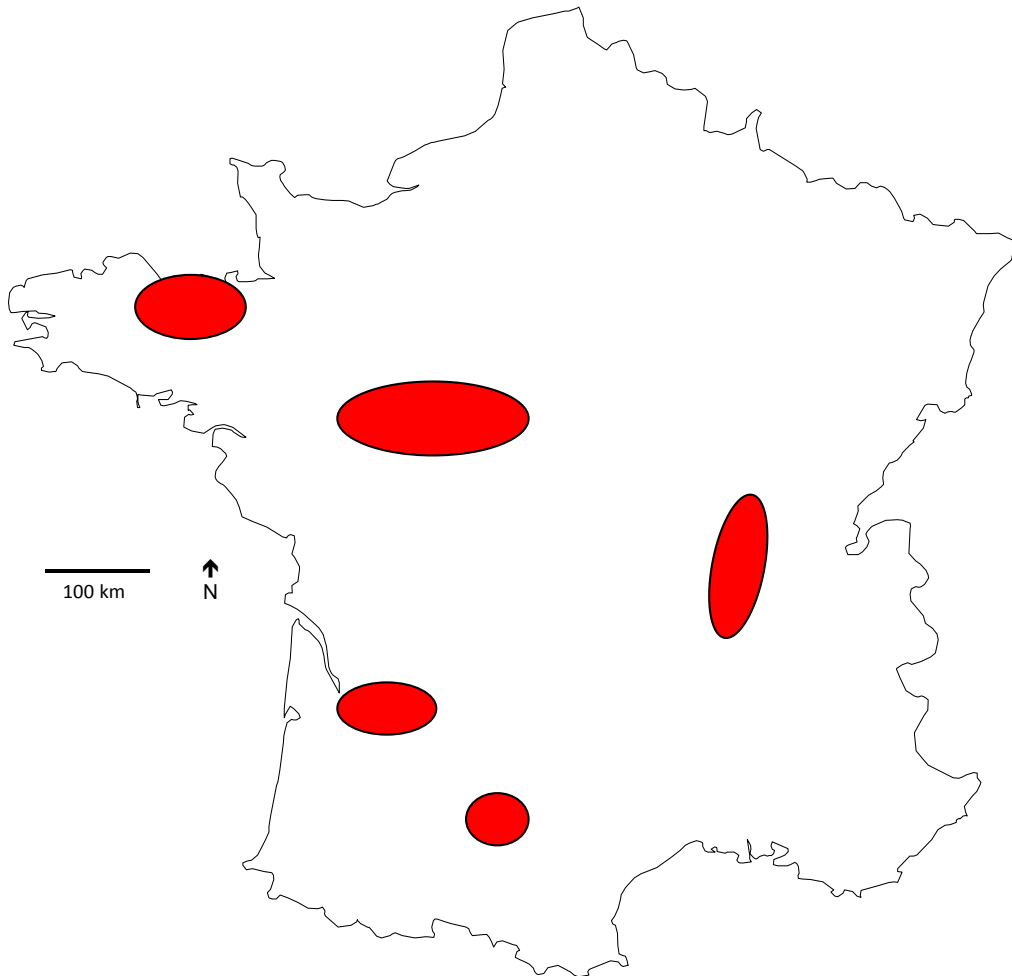


Figure 5. Zones où la résistance aux inhibiteurs de l'ALS a été détectée chez *S. vulgaris* (en rouge).

Figure 5. Areas in France where resistance to ALS inhibitors has been detected in *S. vulgaris* in France (in red).

L'analyse à une échelle plus fine des résultats a aussi montré que la présence de plantes résistantes dans une zone donnée se présentait le plus souvent sous la forme d'une tache (illustré Figure 6). La dynamique de ces taches (stagnation ou expansion) reste à étudier.

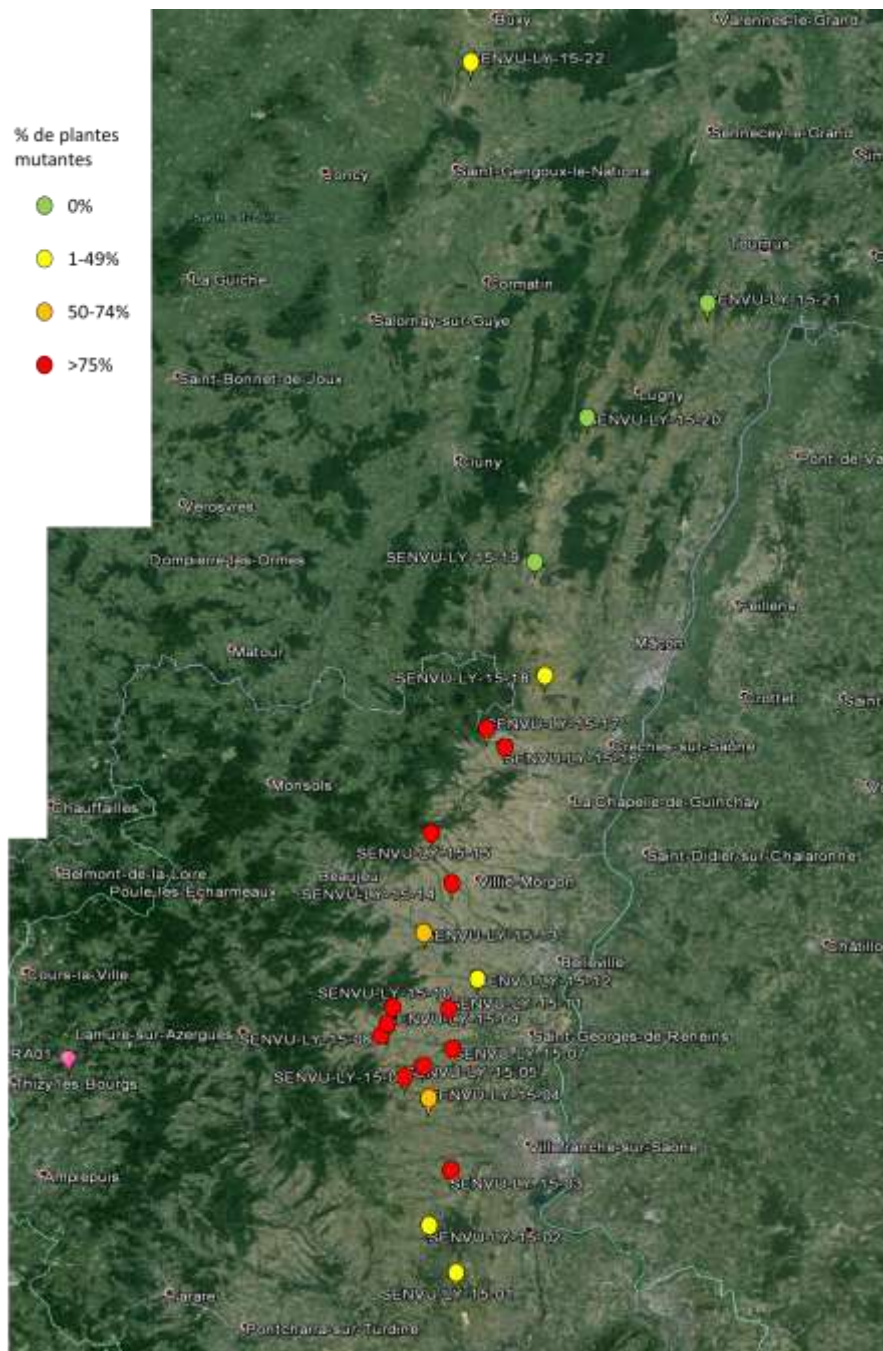


Figure 6. Analyse par génotypage de l'ALS d'un transect de 22 populations de *S. vulgaris* dans les vignobles du Lyonnais et du Beaujolais.

Figure 6. ALS genotyping analysis of one transect including 22 *S. vulgaris* populations in the Lyonnais and Beaujolais vineyards.

DISCUSSION & CONCLUSION

Plusieurs enseignements peuvent être tirés de cette étude :

- La résistance aux inhibiteurs de l'ALS est toujours associée à la détection de mutations de l'ALS chez *S. vulgaris* en France. Comme aucune plante résistante ne portant pas d'allèle mutant résistant de l'ALS n'a été identifiée à ce jour, la présence d'allèles mutants est une cause majeure de résistance des plantes à différents herbicides inhibiteurs de l'ALS appartenant à des familles chimiques différentes (Figure 2).
- Les plantes utilisées pour les tests biologiques de sensibilité aux herbicides étaient génétiquement homogène à l'ALS dans chacune des trois populations étudiées (= toutes homozygotes mutantes

pour un même allèle mutant). Pourtant, une variation de phénotype entre plantes de même génotype a souvent été observé dans une population et/ou entre populations pour une dose d'herbicide donnée, et ce pour la plupart des herbicides testés (Figure 2). Dans certains cas, toutes les catégories de phénotypes allant de R jusqu'à S ont été observées dans une population donnée et à une dose d'herbicide donnée (Figure 2, illustré sur la Figure 1). Deux hypothèses qui ne sont pas mutuellement exclusives peuvent être proposées pour expliquer cette variation. La première hypothèse est que le rapport d'expression entre ALS1 et ALS2 varie entre les plantes. La sensibilité des plantes augmenterait avec le rapport d'expression ALS2 (non mutant) sur ALS1 (mutant), parce que l'effet des allèles ALS1 résistants aux herbicides serait « dilué » par la présence de l'allèle sensible ALS2. De même, les différences globales de sensibilité observée entre les plantes dans les populations 22-Bou et 22-Erq qui pourtant sont toutes homozygotes mutantes Leu-197 ALS1 pourrait être causé par les différences de ratio d'expression entre populations. Toutefois, dans cette hypothèse, les plantes de la population 22-Erq seraient globalement plus résistantes à tous les herbicides testés que les plantes de la population 22-Bou, qui n'est pas le cas pour des herbicides tels que metsulfuron ou iodosulfuron + mésosulfuron (Figure 2). Une deuxième hypothèse est la présence simultanée dans les plantes de *S. vulgaris* des allèles mutants ALS1 et d'un jeu variable de mécanismes de résistance non liés à la cible (RNLC) qui contribueraient également à réduire la sensibilité des plantes à des inhibiteurs de l'ALS. Comme les profils de résistance conférés par les mécanismes de RNLC sont imprévisibles, cette hypothèse est compatible avec la variation phénotypique observée chez les plantes de même génotype à l'ALS et avec le fait que les plantes de la population 22-Bou soient globalement plus résistantes à certains herbicides et moins résistantes à d'autres que les plantes de la population 22-Erq bien qu'elles contiennent le même allèle Leu-197 ALS1. La RNLC est considérée comme la principale cause de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS dans les mauvaises herbes graminées (Délye *et al*, 2013) mais n'a été démontrée à ce jour que dans quatre espèces de mauvaises herbes dicotylédones: *Amaranthus hybridus* (amaranthe, Manley *et al*, 1999) *Sinapis arvensis* (moutarde des champs, Jeffers *et al*, 1996 ; Veldhuis *et al*, 2000), *Papaver rhoeas* (coquelicot, Scarabel *et al*, 2015) et *Ambrosia artemisiifolia* (ambroisie à feuilles d'armoise ; Meyer *et al*, 2016). La situation de *S. vulgaris* ressemble beaucoup à celle du Coquelicot, chez lequel des allèles mutants de l'ALS portant une mutation au niveau du codon 197 sont de loin le mécanisme de résistance le plus répandu et fréquent, mais où des mécanismes de RNLC qui causent la résistance aux inhibiteurs de l'ALS ont été identifiés dans des plantes portant également allèles mutants de l'ALS (Délye *et al*, 2011 ; Scarabel *et al*, 2015). La présence de mécanismes de RNLC à des inhibiteurs de l'ALS dans *S. vulgaris*, et surtout les profils de résistance associés (notamment éventuellement à d'autres modes d'action) est donc une question importante pour le contrôle chimique de cette espèce, et qui devrait être traitée.

- Dans notre étude, nous avons observé une dispersion d'un allèle Leu-197 de l'ALS1 sur plus de 60 km en quelques années à partir de l'événement d'apparition de résistance d'origine (Figure 4), ce qui illustre bien les capacités de dispersion de *S. vulgaris*. Au niveau agronomique, empêcher la propagation d'une résistance chez cette espèce à partir d'un premier foyer est un défi qui reste à relever. Bien que les herbicides avec un mode d'action différent de l'inhibition de l'ALS devraient rester efficace contre *S. vulgaris*, d'autres méthodes de contrôle doivent être mises en œuvre. Comme la persistance des graines de *S. vulgaris* enfouies dans le sol est relativement courte (moins de 10 ans, Robinson *et al*, 2003), un travail du sol profond ou le labour pourraient être mises en œuvre pour réduire le stock. *S. vulgaris* est une mauvaise herbe avec une mobilité élevée combinée à une capacité à germer tout au long de la saison. Par conséquent, les stratégies de gestion doivent viser à limiter son établissement et sa mise à graines. Étant donnée la mobilité de cette espèce, la coordination dans la lutte contre *S. vulgaris* au niveau régional est clairement nécessaire pour que ces stratégies soient efficaces. L'existence de tests PCR de diagnostic devrait par ailleurs se révéler utile, en permettant une confirmation rapide des cas de résistances.

REMERCIEMENTS

ISK Biosciences Europe (Belgique) et Bayer CropScience (France) ont en partie financé des travaux et fourni des populations. Nous remercions toutes les personnes qui nous ont envoyé des échantillons de *S. vulgaris*.

BIBLIOGRAPHIE

Délye C., Causse R., Gautier V., Poncet C., Michel S., 2016 - Genetic basis, evolutionary origin and spread of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in common groundsel (*Senecio vulgaris*). *Pest Management Science* 72, 89-102.

Délye C., Causse R., Michel S., 2015 - Le séneçon commun résiste aux inhibiteurs de l'ALS. *Phytoma – LdV* 681, 35-38.

Délye C., Jasieniuk M. and Le Corre V., 2013 - Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics* 29, 649-658.

Délye C., Pernin F., Scarabel L., 2011 - Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Plant Science* 180, 333-342.

Jeffers G.M., O'Donovan J.T., Hall J.M., 1996 - Wild mustard (*Brassica kaber*) resistance to ethametsulfuron but not to other herbicides. *Weed Technology* 10, 847-850.

Manley B.S., Hatzios K.K., Wilson H.P., 1999 - Absorption, translocation, and metabolism of chlorimuron and nicosulfuron in imidazolinone-resistant and -susceptible smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*). *Weed Technology* 13, 759-764.

Neff M.M., Neff J.D., Chory J., Pepper A.E., 1998 - dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant Journal* 14, 387-392.

Robinson D.E., O'Donovan J.T., Sharma M.P., Doohan D.J., Figueroa R., 2003 - The biology of canadian weeds. 123. *Senecio vulgaris* L. *Canadian Journal of Plant Science* 83, 629-644.

Scarabel L., Pernin F., Délye C., 2015 - Occurrence, genetic control and evolution of non-target-site based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase (ALS) in the dicot weed *Papaver rhoeas*. *Plant Science* 238, 158-169.

Veldhuis L.J., Hall L.M., O'Donovan J.T., Dyer W., Hall J.C., 2000 - Metabolism-based resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2986-2990.