

DÉTECTION D'UN CAS DE RÉSISTANCE AU CARBENDAZIME CHEZ L'AGENT DU CHANCRE DU
PÊCHER ET DE L'AMANDIER (*FUSICOCCUM AMYGDALI*) EN FRANCE

S. FONTAINE¹, F. REMUSON¹, L. CADDoux¹, B. BARRÈS¹

¹Université de Lyon, Anses, INRA, USC CASPER, 69007 Lyon, France

RESUME

Fusicoccum amygdali est responsable du chancre à *Fusicoccum* chez les pêchers (*Prunus persica*) et les amandiers (*Prunus dulcis*). La gestion de cette maladie est réalisée par des méthodes prophylactiques et des traitements fongicides. Le thiophanate-méthyl, un inhibiteur de la polymérisation de la β -tubuline, est homologué pour l'usage pêche et amandier depuis 1975 et 1997, respectivement. Le nombre d'applications de cette substance active est limité à un seul traitement annuel compte tenu du risque élevé d'évolution de résistance. Dans le cadre des plans de surveillance des résistances aux produits phytosanitaires mis en œuvre par la DGAL, des prélèvements de chancre à *Fusicoccum* ont été réalisés dans des vergers d'amandiers du Gard et de Corse. Cette étude présente la sensibilité *in vitro* d'isolats de *F. amygdali* au carbendazime et au diéthofencarbe, deux anti-microtubules (respectivement de la classe des benzimidazoles et des phénylcarbammates). Le gène de la β -tubuline a été séquencé pour caractériser génétiquement les résistances observées.

Mots-clés : *Fusicoccum amygdali*, résistance aux fongicides, benzimidazoles, phénylcarbammates, β -tubuline.

ABSTRACT

The constriction canker caused by *Fusicoccum amygdali* affects peach (*Prunus persica*) and almond trees (*Prunus dulcis*). The management of this disease is performed by prophylactic methods and fungicides treatments. Thiophanate-methyl is a β -tubulin polymerization inhibitor that has been registered for use in peaches and almonds orchards since 1975 and 1997, respectively. Because it was identified as a pesticide with a high risk of resistance evolution, fungicide treatment with this active ingredient is limited to one spraying a year. As part of the fungicide resistance surveys implemented by the French government, *Fusicoccum* canker samples have been taken from orchards in the south of France. This study presents *bioassays* achieved on *F. amygdali* isolates with two β -tubulin inhibitors. The β -tubulin gene has been sequenced to identify the mutation involved in resistance.

Keywords: *Fusicoccum amygdali*, fungicide resistance, benzimidazoles, phenylcarbammates, β -tubulin.

INTRODUCTION

Fusicoccum amygdali est responsable du chancre à fusicoccum chez les pêchers et les amandiers des régions méditerranéennes et des États-Unis. Plus récemment, il a été également décrit dans des vergers du sud de la Chine [Bai et al., 2015] et de la Hongrie [Varjas et al., 2017]. Ce phytopathogène provoque des lésions allongées brunes et rougeâtres, le flétrissement des jeunes rameaux et l'assèchement des jeunes feuilles, des fleurs et des fruits. Les chancres apparaissent au printemps et se développent jusqu'à la fin de l'été. *F. amygdali* produit au niveau des chancres des pycnides noires donnant de minuscules filaments muqueux blancs, appelés cirrhes. Les spores sont libérées par ces cirrhes lorsqu'il pleut, puis contaminent d'autres arbres en pénétrant via des blessures de l'écorce. Dans les vergers de pêchers, il a été démontré que la maladie peut induire des pertes de rendements et donc des pertes économiques conséquentes (Lalancette et al., 2000). La gestion de cette maladie est réalisée via des méthodes prophylactiques (choix des cultivars moins sensibles, taille et remplacement des vergers plus anciens) et des traitements fongicides. En France, le contrôle de ce chancre, dans les vergers d'amandiers, est basé sur l'utilisation de deux substances actives: le dithianon (un fongicide multisite) et le thiophanate-méthyl (un inhibiteur de la polymérisation de la β -tubuline). L'activité fongicide de cette dernière substance active n'est effective qu'après métabolisation, par les champignons, du thiophanate-méthyl en carbendazime. Le thiophanate-méthyl appartient à la famille des benzimidazoles, premiers fongicides anti-tubuline commercialisés dans les années 1960. La résistance aux benzimidazoles s'est rapidement répandue et plus de 100 espèces de champignons ont développé une résistance à cette famille [www.frac.info]. Le principal mécanisme de résistance repose sur une modification de la cible du fongicide et plusieurs mutations pouvant affecter six codons du gène (en particulier les codons 198 et 200) codant pour la β -tubuline ont été décrites (Ma et Michailides, 2005).

Le thiophanate-méthyl est utilisé contre le chancre à fusicoccum depuis plus de vingt ans. Le risque d'évolution de cette résistance est considéré comme élevé et il est conseillé de limiter les traitements avec cette substance active à une seule application par an. Cette étude présente les résultats de sensibilité *in vitro* à des fongicides anti-microtubules d'isolats de *F. amygdali*, collectés de 2014 à 2018, provenant de vergers d'amandiers ou de pêchers. Le gène codant pour la β -tubuline des souches présentant des phénotypes résistants a été séquencé afin d'identifier si les phénotypes observées pouvaient être reliés à une(des) mutation(s) de la cible.

MATERIELS ET MÉTHODES

Matériel fongique :

Des rameaux présentant des symptômes de chancre ont été échantillonnés dans deux vergers : un de pêcher en 2014 et un d'amandier en 2016 (Tableau I). Ces vergers ont été sélectionnés sur la base de l'historique local d'utilisation des anti-microtubules. A réception, les rameaux ont été placés en chambre humide pendant 24 heures afin de permettre l'émission de cirrhes. Les cirrhes ont ensuite été prélevées avec une aiguille stérile afin de préparer une suspension de spores à 10 000 spores / ml. Vingt-quatre heures plus tard, les spores germées ont été prélevées individuellement sous loupe binoculaire et placées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar) amendé avec du chloramphenicol à 200 mg / L afin de limiter le développement de contaminations bactériennes. Les cultures monospores de *F. amygdali* obtenues ont été par la suite incubées à 22°C avec une photopériode 16h de jour / 8h de nuit pendant une semaine avant de débiter les tests *in vitro*.

Une souche de référence, nommée CBS 428.64 et fournie par Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Utrecht, Pays-Bas) a été utilisée dans cette étude. Cette souche a été isolée de chancres de pêchers en 1964 en France et elle est considérée comme une souche sensible aux anti-microtubules.

Tableau I: Origine géographique, date d'échantillonnage et nombre des souches monospores de *F. amygdali* isolées

Table I : Geographical origin, sampling date and number *F. amygdali* monospore growths isolated

REFERENCES	ANNEE D'ECHANTILLONAGE	REGION	VILLE	NOMBRE DE SOUCHES MONOSPORES ISOLEES
CBS 428.64	1964	Nouvelle Aquitaine	Villenave d'Ornon	1
14-020	2014	Occitanie	Saint Gilles	8
16-219	2016	Corse	Ghisonaccia	24

Test de sensibilité *in vitro* aux fongicides

Deux principes actifs ont été testés : le carbendazime et le diéthofencarbe. Le carbendazime, qui est le métabolite actif du thiophanate-méthyl, est couramment utilisé dans des tests *in vitro* pour évaluer la sensibilité au thiophanate-méthyl, du fait de sa plus grande sensibilité. Le diéthofencarbe est un anti-microtubules de la classe des phénylcarbammates, se fixant différemment sur la β -tubuline. Les souches sensibles au carbendazime sont en général naturellement résistantes au diéthofencarbe. Les souches résistantes au carbendazime présentent une résistance croisée positive ou négative avec le diéthofencarbe, selon la mutation affectant le gène codant pour la β -tubuline, comme cela a déjà été observé chez d'autres agents pathogènes (e.g. *Botrytis cinerea* ; Kato *et al.*, 1984 ; Malandrakis *et al.*, 2011).

Des solutions mères à 20 000 mg.L⁻¹ ont été préparées pour chaque substance active dans l'éthanol à 96°. Des aliquots de ces solutions mères ont été incorporés au milieu PDA pour fournir des concentrations finales de 0,001 - 0,003 - 0,01 - 0,03 - 0,1 - 0,3 - 1 - 3 - 10 - 30 et 100 mg.L⁻¹ pour chacune des deux substances actives avec un taux d'incorporation d'éthanol final dans le milieu de 0.5%. Des disques mycéliens de 8 mm de diamètre ont été transférés sur chacune des boîtes de Petri de PDA amendé avec une des substances actives à l'exception d'une boîte PDA sans fongicide considérée comme le témoin non traité auquel a été uniquement incorporé 0.5% d'éthanol. Pour chaque substance active et concentration testées, la croissance mycélienne radiale a été mesurée et comparée avec le témoin non traité après 7 jours d'incubation à 22 °C avec une photopériode 16h de jour / 8h de nuit. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport à la modalité non traitée. Ainsi, pour chacune des substances actives, la CI50 (Concentration en mg/L Inhibitrice de 50% de la croissance radiale) a été déterminée graphiquement en exprimant le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale par rapport au témoin non traité en fonction du log des concentrations en fongicides.

Extraction d'ADN

L'ADN total a été isolé à partir de mycélium congelé recueilli sur milieu PDA. Le broyage du mycélium a été réalisé à l'aide d'une bille d'acier (4.76 mm de diamètre) dans un TissueLyser (Qiagen®) avec deux étapes d'agitation de 45s à 30 Hz. Le broyage a été suivi d'une incubation de 2 heures à 65 °C dans 850µL de tampon CTAB (bromure d'étyltriméthylammonium) préalablement préchauffé à 65°C. Puis l'ADN a été purifié en ajoutant 570µL de chloroforme et d'alcool isoamylique (24 :1) suivi d'une centrifugation de 10 min à 13 000 tr.min⁻¹ à 4°C pour séparer les contaminants dans la phase organique, des acides nucléiques dans la phase aqueuse. Ensuite, la précipitation de l'ADN a été effectuée en ajoutant 2/3 du volume d'isopropanol à la phase aqueuse avec une incubation pendant une nuit à -20 °C. Après une centrifugation de 10 min à 13000 tr.min⁻¹ à 4 °C, le culot d'ADN a été lavé deux fois avec 800 µL d'éthanol à 70% à -20°C. Le culot d'ADN a été séché puis dissous dans 100 µL d'eau ultra-pure. La concentration d'ADN a été ensuite mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop, Thermo-Scientific®).

Séquençage du gène de la β -tubuline

Compte tenu de la taille des gènes codant pour la β -tubuline (plus de 1000pb chez les ascomycètes), le séquençage a été réalisé avec deux couples d'amorces en s'inspirant des couples déjà publiés par Glass *et Donaldson* (1995). Le premier couple d'amorces "Bt2a / Bt3b" permet l'amplification du fragment aval du gène de la β -tubuline, alors que la seconde paire "Bt3a / Bt1b" permet l'amplification du fragment amont (Tableau II). Les fragments amplifiés avec chacun des couples d'amorces se recouvrent partiellement afin d'obtenir un fragment de 1391 pb codant du 22^{ième} au

398^{ième} acide aminé de la β -tubuline (donc incluant les codons 198 et 200). Deux amplifications PCR séparées ont été réalisées. Chacune d'entre elles a été réalisée dans des volumes de 50 μ L contenant 1 x de tampon Fermentas® Taq polymérase, 0,5 μ M de chacune des amorces, 2 mM de chaque dNTPS, 25 mM de MgCl₂, 1,25 unité de Taq polymérase et 2 μ L d'ADN. Les cycles de PCR comprenaient une première dénaturation à 95°C pendant 3 min suivies de 35 cycles de PCR avec une dénaturation à 94°C pendant 30s, une hybridation à 58°C pendant 30s et une étape d'élongation à 72°C pendant 90s. Une étape d'élongation finale a été réalisée à 72°C pendant 10 min. Le séquençage par la méthode Sanger des produits de PCR a été réalisé par Genewiz®. Les analyses des séquences obtenues ont été réalisées avec le logiciel Bio-Edit.

Tableau II : Séquences des amorces utilisées pour le séquençage du gène de la β -tubuline
Table II : Primers sequences used for the β -tubulin sequencing

AMORCES	SEQUENCES
Bt2a (publiée par Glass et Donaldson)	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
Bt3b (= Bt1a en antisens chez Glass et Donaldson)	CATGAAGAAGTGGAGACGGGGGAA
Bt3a (= Bt2b en sens chez Glass et Donaldson)	GCCAAGGGTCACTACACTGAGGGT
Bt1b (publiée par Glass et Donaldson)	GACGAGATCGTTCATGTTGAAGTC

RESULTATS

Test de sensibilité *in vitro* aux fongicides

Les CI50 obtenues avec la souche de référence sensible (CBS 428.64) lors des tests de sensibilité au carbendazime et au diéthofencarbe en croissance mycélienne sont respectivement de 0,02 mg.L⁻¹ et 42 mg.L⁻¹ (Tableau III).

Les valeurs de CI50 observées avec le carbendazime pour les 8 cultures monospores isolées du verger de pêchers "14-020" sont égales ou inférieures à 0,06 mg. L⁻¹. Ces souches ont été classées comme sensibles au carbendazime avec un facteur de résistance (CI50 de la souche testée / CI50 de la référence sensible) maximal égal à 2,9 (Table III).

Les 24 cultures monospores isolées du verger d'amandiers "16-219" ont montré des CI50 supérieures à 100 mg.L⁻¹ pour le carbendazime, correspondant à des facteurs de résistance supérieurs à 5000.

Les CI50 obtenues avec le diéthofencarbe pour toutes les cultures mycéliennes isolées des vergers 14-020 et 16-219 sont élevées et comprises entre 27.2 et 72 mg.L⁻¹. Ces souches ont un niveau de sensibilité au diéthofencarbe semblable à la souche de référence CBS 428.64.

Séquençage du gène de la β -tubuline

Le séquençage de la β -tubuline a été réalisé sur la souche de référence CBS 428.64, sur deux cultures monospores du verger 14-020 présentant une sensibilité au carbendazime proche de la souche CBS 428.64 (FR=1.2 – 14-020-10H et 14-020-11D) et sur 5 cultures monospores du verger 16-219 résistantes au carbendazime (FR> 5000 – références 16-219-7; 16-219-14; 16-219-15, 16-219-18 et 16-219-35).

Les analyses de séquençage révèlent la présence d'une mutation entraînant le remplacement de l'acide glutamique par la lysine au codon 198 (E198K) dans toutes les souches résistantes au carbendazime provenant du verger situé en Corse (ref :16-219). Cette substitution est provoquée par un changement de guanine en alanine dans le triplet de nucléotides en position 198 (GAG / AAG). Les séquences partielles de gènes de β -tubuline ont été déposées dans GenBank pour un mutant et une souche non mutante (numéro d'accèsion CBS 428.64 et MG996732 respectivement). Aucune mutation n'a été détectée dans la séquence du gène codant pour la β -tubuline des souches sensibles au carbendazime collectées dans le verger "14-020", comparativement à la souche de référence (CBS 428.64).

Tableau III : CI50 des cultures monospores de *F. amygdali* lors des tests *in vitro* réalisés avec le carbendazime et le diéthofencarbe. FR : facteur de résistance = CI50 de la souche testée / CI50 de la référence sensible

Table III : IC50 of *F. amygdali* monospore growths bioassays with carbendazim and diethofencarb. FR : resistant factor = IC50 of strain assayed / IC50 of sensitive reference

REFERENCES	Carbendazime		Diethofencarbe	
	CI50 (mg/L)	FR	CI50 (mg/L)	FR
14-020-10D	0,05	2,6	48,20	1,1
14-020-10E	0,05	2,6	33,30	0,8
14-020-10F	0,06	2,8	29,10	0,7
14-020-10G	0,05	2,5	27,20	0,6
14-020-10H	0,05	2,5	35,30	0,8
14-020-11D	0,05	2,5	34,00	0,8
14-020-11E	0,05	2,5	36,00	0,9
14-020-14D	0,05	2,7	33,30	0,8
16-219-02	>100	>5000	56,00	1,3
16-219-04	>100	>5000	55,00	1,3
16-219-05	>100	>5000	53,00	1,3
16-219-07	>100	>5000	39,00	0,9
16-219-08	>100	>5000	44,00	1,0
16-219-09	>100	>5000	43,30	1,0
16-219-14	>100	>5000	40,00	1,0
16-219-15	>100	>5000	15,00	0,4
16-219-16	>100	>5000	42,00	1,0
16-219-17	>100	>5000	72,00	1,7
16-219-18	>100	>5000	40,00	1,0
16-219-20	>100	>5000	41,00	1,0
16-219-24	>100	>5000	42,00	1,0
16-219-25	>100	>5000	35,00	0,8
16-219-27	>100	>5000	54,00	1,3
16-219-28	>100	>5000	44,00	1,0
16-219-29	>100	>5000	76,00	1,8
16-219-30	>100	>5000	36,00	0,9
16-219-32	>100	>5000	38,00	0,9
16-219-33	>100	>5000	30,00	0,7
16-219-35	>100	>5000	52,00	1,2
16-219-36	>100	>5000	44,00	1,0
16-219-37	>100	>5000	53,00	1,3
16-219-38	>100	>5000	44,00	1,0
CBS 428.64	0,02	1,0	42	1

Souligné : souches sélectionnées pour le séquençage du gène de la β -tubuline

DISCUSSION - CONCLUSION

Cette étude a permis d'identifier, pour la première fois, des souches de *F. amygdali* résistantes au carbendazime dans un verger d'amandiers français. Les 24 souches isolées de ce verger situé en Corse sont résistantes au carbendazime. Les facteurs de résistance mesurés dans des conditions *in vitro* sont très élevés (supérieurs à 5000). Une perte d'efficacité du thiophanate-méthyl est donc probable dans ce verger. Les souches isolées d'un autre verger en 2014, montrent une sensibilité

au carbendazime équivalente à celle observée dans la souche sensible de référence. Le séquençage du gène de la β -tubuline à partir de l'ADN de la souche de référence, de souches de terrain sensibles (2) et résistantes (5) révèle l'existence d'une mutation affectant le codon 198 dans toutes les souches résistantes au carbendazime. La mutation provoque le remplacement de l'acide glutamique par une lysine à cette position. Cette substitution, appelée E198K, a déjà été décrite chez plusieurs phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea* (Yarden et al., 1993, Leroux et al. 2002), *Venturia inaequalis*, *Monilia Fructicola*, *Penicillium spp.* ou *Sclerotinia homoeocarpa* (Koenraadt et al., 1992).

Le gène de la β -tubuline de *F. amygdali* n'a pu être séquencé dans sa totalité. La séquence obtenue code du 22^{ème} au 398^{ème} acide aminé de la protéine. Dans les bases de données, le gène de la β -tubuline complet des champignons appartenant à la même famille que *F. amygdali*, les *Diaporthaceae*, code pour une protéine de 447 acides aminés. Notre séquençage couvre la majorité des codons connus pour être impliqués dans la résistance aux benzimidazoles (50^{ème}, 167^{ème}, 198^{ème}, 200^{ème} - Young et al., 2015) à l'exception de deux codons du 6^{ème} et du 240^{ème}, décrits uniquement chez *Tapesia yallundae* et *Monilia* (Ma et Michailides et al., 2005). Comparativement aux autres gènes connus de la β -tubuline des *Diaporthaceae*, la séquence de *F. amygdali* présente une thréonine au lieu d'une sérine en position 32^{ème} de la protéine. Les deux acides aminés sont polaires avec la chaîne latérale non chargée et ce résidu n'est pas connu pour avoir un rôle fonctionnel. Cette spécificité ne doit probablement donc pas avoir d'impact en termes de sensibilité aux inhibiteurs de la β -tubuline. Les tests de croissance mycélienne réalisés avec du diéthofencarbe ont mis en évidence des doses d'inhibition élevées et semblables pour les souches isolées récemment et la souche de référence isolée une vingtaine d'années avant la première homologation du diéthofencarbe. Ce fongicide ne semble donc pas avoir d'efficacité sur l'espèce *F. amygdali* qui apparaît comme naturellement résistante au diéthofencarbe. La mutation E198K présente chez les souches résistantes au carbendazime, n'a donc aucun effet vis-à-vis du diéthofencarbe, comme cela a déjà été observé chez d'autres espèces naturellement résistantes au diéthofencarbe : *V. inaequalis*, *M. fructicola*, *Penicillium spp.* ou *S. homoeocarpa* (Koenraadt et al., 1992) et *B. cinerea* (Liu et al, 2016; Malandrakis et al, 2011).

Enfin, le thiophanate-méthyl étant le seul fongicide systémique homologué pour lutter contre la chancre à fusicoccum, la surveillance de la résistance de ce phytopathogène vis-à-vis de ce fongicide va être poursuivie afin de mieux connaître sa présence dans les vergers français.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les correspondants des DRAAF-SRAL et des organisations professionnelles du réseau national de Surveillance Biologique du Territoire (SBT) pour la réalisation des prélèvements et Anne-Sophie Walker et les relecteurs pour leurs commentaires constructifs sur une précédente version de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

Bai Q., Zhai L., Chen X., Hong N., Xu W., Wang G, 2015 - Biological and Molecular Characterization of Five Phomopsis Species Associated with Pear Shoot Canker in China. *Plant Disease*, 99, 12, 1704-12.

Glass N.-L. et Donaldson G.-C., 1995 - Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4, 1323-1330.

Kato T.-K., Suzuki J., Takahashi K., Kamoshita K., 1984 - Negatively correlated crossresistance between benzimidazole fungicides and methyl N-(3,5- dichlorephenyl)-carbamate, *J. Pest. Sci.*, 9, 489-495.

Koenraadt H., Somerville SC., Jones A., 1992 - Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, 82, 11, 1348-1354.

Lalancette N., Polk DF., 2000 - Estimating yield and economic loss from constriction canker of peach. *Plant disease*. 84, 9, 941-946.

Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., Chapeland F, 2002 - Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58, 9, 876-888.

Liu S., Che Z., Chen G., 2016 - Multiple-fungicide resistance to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea* from tomato in Henan Province, China. *Crop Protection*, 84, 56-61.

Ma Z., Michailides TJ., 2005 - Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24, 10, 853-863.

Malandrakis A., Markoglou A., Ziogas B., 2011 - Molecular characterization of benzimidazole-resistant *B. cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb. *Pesticide biochemistry and physiology*, 99, 1, 118

Yarden O., Katan T., 1993 - Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 83, 12, 1478-1483.

Varjas V., Vajna L., Izsépi F., Nagy G., Pájtli É., 2017 - First Report of *Phomopsis amygdali* Causing Twig Canker on Almond in Hungary. *Plant Disease*, 101, 9, 1674.

Young D.-H., 2015 - Anti-tubulin Agents. In: In: Ishii H. HDW, editor. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Tokyo: Springer; 93-103.