

ETAT DES LIEUX DE LA RESISTANCE DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* AUX SDHI ET DE SA
GESTION EN CULTURE DE COLZA

A. PENAUD ⁽¹⁾, B. BARRES ⁽²⁾, F. REMUSON ⁽²⁾, F. DUROUEIX ⁽¹⁾, A.-S. WALKER ⁽³⁾

⁽¹⁾ TERRES INOVIA, 1, Avenue Lucien Brétignières 78850 THIVERVAL-GRIGNON, FRANCE.

a.penaud@terresinovia.fr - f.duroueix@terresinovia.fr

⁽²⁾ ANSES Lyon - Unité Résistance aux Produits Phytosanitaires, 31 avenue Tony Garnier, 69364 LYON Cedex 07 FRANCE. benoit.barres@anses.fr- florent.remuson@anses.fr

⁽³⁾ INRA, UMR 1290 BIOGER, Bât 13, Avenue Lucien Brétignières, BP01, 78850 THIVERVAL-GRIGNON FRANCE. anne-sophie.walker@inra.fr

RÉSUMÉ

La sclérotiniose du colza constitue l'une des maladies les plus dommageables du colza et pour laquelle la protection de la culture est assurée par l'application d'au moins un fongicide à la chute des premiers pétales (stade BBCH 65). Or, l'utilisation répétée de fongicide inhibant la succinate deshydrogénase (SDHI) a conduit à la sélection de souches résistantes. Suivie dans le cadre d'un monitoring conduit chaque année par l'Anses et Terres Inovia, cette résistance est causée par une des dix mutations détectées dans les sous-unités protéiques B, C et D de la succinate deshydrogénase, cible des SDHI. Elle a rapidement progressé pour tendre vers une stabilisation au cours des 3 dernières années. Ces résultats sont partagés et mis en perspectives au sein d'un groupe de travail AFPP et une note commune annuelle Anses-INRA-Terres Inovia pronant une gestion raisonnée des molécules est diffusée auprès des professionnels.

Mots-clés : *Sclerotinia sclerotiorum*, colza, résistance, boscalide, SDHI.

ABSTRACT

STATUS OF RESISTANCE TO SDHIs OF *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* AND ITS MANAGEMENT IN RAPESEED CROPPING

Sclerotinia stem rot is one of the most damaging diseases of rapeseed. The protection of the crop against *Sclerotinia sclerotiorum* is ensured by the application of at least one fungicide at the fall of the first petals (stage BBCH 65). However, the repeated use of succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI) has led to the selection of resistant strains. An annual monitoring conducted by ANSES and Terres Inovia allow us to follow the SDHI resistance caused by one of the ten mutations detected in the subunits B, C and D of the succinate dehydrogenase (SDH). This resistance has rapidly progressed to tend towards stabilisation over the last 3 years. These results are shared and put into perspective in a AFPP working group and an annual joint note Anses-INRA-Terres Inovia promoting a management of molecules is disseminated to professionals.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, rapeseed, resistance, boscalid, SDHI.

INTRODUCTION

Le colza est le premier oléagineux cultivé en France, avec près de 1.5 millions d'hectares implantés chaque année. La sclérotiniose causée par *Sclerotinia sclerotiorum* demeure une des maladies majeures du colza, même si elle n'est véritablement nuisible et dommageable que deux à trois années par décennie, du fait de conditions climatiques très souvent défavorables au développement de l'épidémie (Penaud *et al*, 2009).

En l'absence de variétés résistantes, la protection contre cette maladie repose essentiellement sur l'application quasi-systématique en début de floraison d'au moins un traitement fongicide préventif car il n'existe pas de traitement curatif efficace. Or, ce traitement constitue l'essentiel de l'IFT fongicide appliqué sur la culture du colza.

Actuellement, cette protection repose sur trois modes d'action - les inhibiteurs de la déméthylation des stérols (IDMs), les inhibiteurs du complexe III de la respiration (Qols) et les inhibiteurs du complexe II de la respiration (SDHIs). Le boscalide premier SDHI à obtenir une AMM contre le sclerotinia du colza en 2006, a représenté au cours de la dernière décennie au moins 75% des fongicides appliqués contre le sclerotinia du colza. Dès 2007, il a fait l'objet d'un monitoring dans le réseau de surveillance national multi-partenaires DGAL-Anses-Terres Inovia.

Les données issues de cette surveillance sont annuellement discutées au sein du groupe de travail "Résistance *Sclerotinia* du colza" de la commission maladies de Végéphyt (ex-AFPP) et mises à disposition des professionnels, au travers d'une "Note Commune" Anses-INRA-Terres Inovia.

Cette note technique prend en compte l'ensemble des moyens de lutte disponibles (agronomiques, biologiques et chimiques) et constitue une base de raisonnement pour une gestion durable des moyens de lutte, en tenant compte de l'état des dernières connaissances concernant les phénomènes de résistance.

L'objet de cette communication est donc de dresser un état des lieux actualisé de la résistance aux SDHI du sclerotinia du colza sur le territoire français accompagné d'un bilan des mutations rencontrées dans les populations résistantes de *S. sclerotiorum* au regard de la gestion de la résistance qui a été conseillée depuis l'émergence des premiers isolats résistants au boscalide.

MATERIEL ET MÉTHODES

ECHANTILLONNAGE

Les prélèvements des échantillons sont organisés de manière à couvrir l'ensemble des régions françaises productrices de colza, suivant le plan de surveillance ENI-Résistances de la DGAL-SDQPV délégué à l'Anses, complété par le plan d'action Résistance sclerotinia de Terres Inovia. Les échantillons sont prélevés dans des parcelles non traitées ou des parcelles de production où il y a échec de la protection fongicide appliquée.

Pour chaque site retenu, une douzaine de sclérotés sont récoltés sur/dans des tiges de colza symptomatiques, à raison d'un sclérote par plante. Les sclérotés récoltés font ensuite l'objet d'un test phénotypique et/ou génotypique.

PHENOTYPAGE DE LA RESISTANCE AUX SDHI

Les sclérotés désinfectés superficiellement sont coupés en deux, déposés face sectionnée sur milieu de culture PDA et maintenus à l'obscurité à 20°C durant 8 à 10 jours. Les colonies sont, si besoin, repiquées une nouvelle fois sur milieu PDA pour obtenir des souches pures. Un implant mycelien, prélevé sur le front de croissance de la colonie, est alors déposé sur des boîtes de test contenant un milieu Sisler-succinate (composition pour 1 litre : 2g de KH_2PO_4 , 2g de K_2HPO_4 , 1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5g de MgSO_4 , 5g de Succinate disodium, 2g d'extrait de levure, 12.5 g d'Agar) amendé avec 0.5% d'éthanol ou du boscalide (produit technique pur solubilisé dans l'éthanol) à la concentration finale de 2 mg/l. Le diamètre des colonies est ensuite mesuré après 3 jours d'incubation à l'obscurité à 20°C. La croissance dans la modalité traitée est ensuite rapportée à celle de la modalité témoin : les souches sont considérées comme résistantes au boscalide lorsque cette croissance est supérieure à 50%. Pour ces souches, le test est alors répété, en ajoutant une modalité à 5mg/l de boscalide.

GENOTYPAGE DE LA RESISTANCE AUX SDHI

La méthode de biologie moléculaire HRM (High Resolution Melt) précédemment mise au point par Terres Inovia avec ses 4 paires d'amorces est utilisée en routine pour détecter les mutations présentes chez les souches phénotypées résistantes. En complément, un séquençage des gènes codant pour les sous-unités B, C et D de la succinate deshydrogénase est opéré pour les souches résistantes ne répondant pas en HRM.

EFFICACITE AU CHAMP

Un réseau d'essais d'évaluation au champ de fongicides vis-à-vis du sclérotinia est implanté chaque année par Terres Inovia. Le dispositif en blocs de Fisher à 4 répétitions compte parmi les modalités testés, la référence Pictor Pro 0.5 kg/ha et des associations SDHI et IDM. En présence d'attaque de sclérotinia, le taux de tiges principales attaquées est estimé à partir de l'observation de 100 tiges par parcelle élémentaire. L'efficacité moyenne est calculée par rapport au témoin non traité.

RESULTATS

DYNAMIQUE SPATIO-TEMPORELLE DE LA RESISTANCE AUX SDHI

La résistance au boscalide, premier SDHI utilisé sur le colza, est suivie depuis 2007 dans les populations collectées par le réseau Anses-Terres Inovia à l'aide des tests phénotypiques en dose discriminante de 2 mg/l de boscalide.

Depuis la première souche résistante détectée en Lorraine en 2008, cette résistance est à présent régulièrement décelée à la faveur des épidémies dans les régions fortement productrices de colza. Malgré une faible pression sclérotinia en 2016 et 2017, des souches résistantes ont pu être mise en évidence en régions Ile de France, Normandie et Centre-Val-de-Loire (Figure 1).

Si la résistance au boscalide est restée confidentielle suite à sa toute première détection en 2008, elle n'a véritablement progressé qu'à partir de 2014, où dans un tiers des parcelles échantillonnées, la population de sclérotines résistants représentait 17,5% des sclérotines analysés (Figure 2). Depuis, la fréquence de sites avec résistance oscille entre 32% et 54% mais il convient de relativiser la représentativité de cette fréquence les années de faible pression comme 2015 et 2017 (nombre de sites réduit). Globalement, la tendance serait plutôt à une stabilisation de la progression de la résistance au boscalide. La proportion de sclérotines résistants est de l'ordre de 10 à 15% de l'ensemble des sclérotines analysés annuellement. Mais en 2017, cette proportion de sclérotines résistants s'élève en moyenne à 40% des sclérotines analysés, avec des prélèvements parcellaires où 80 à 100% des sclérotines sont caractérisés comme résistants.

Figure 1 : Répartition spatiale de la résistance aux SDHI chez *S. sclerotiorum* en France en 2016-17. (Les populations colorées en rouge comportaient au moins un sclérote résistant).

Spatial distribution of SDHI resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* in France in 2016-17 (Populations in red had at least one resistant sclerotium).

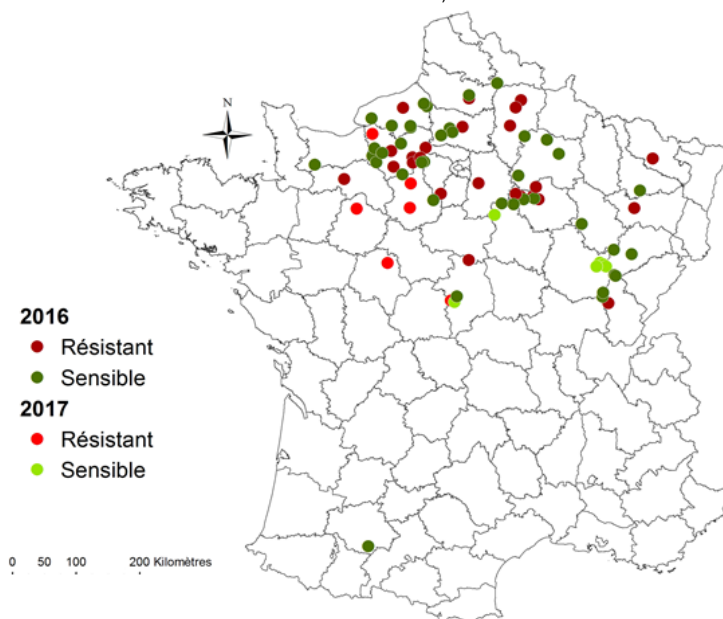
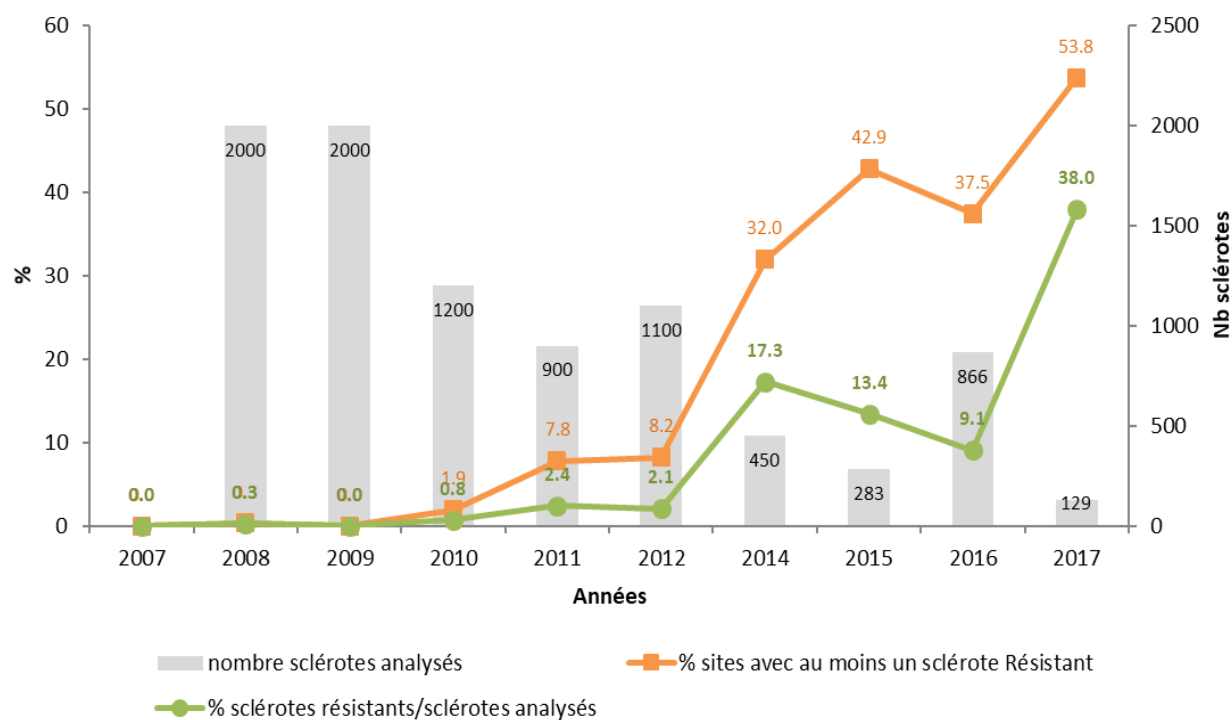


Figure 2 : Evolution temporelle de la résistance aux SDHI chez *S. sclerotiorum* en France sur la base d'un minimum de 10 sclérotés analysés par site

Temporal evolution of SDHI resistance in *S. sclerotiorum* in France.

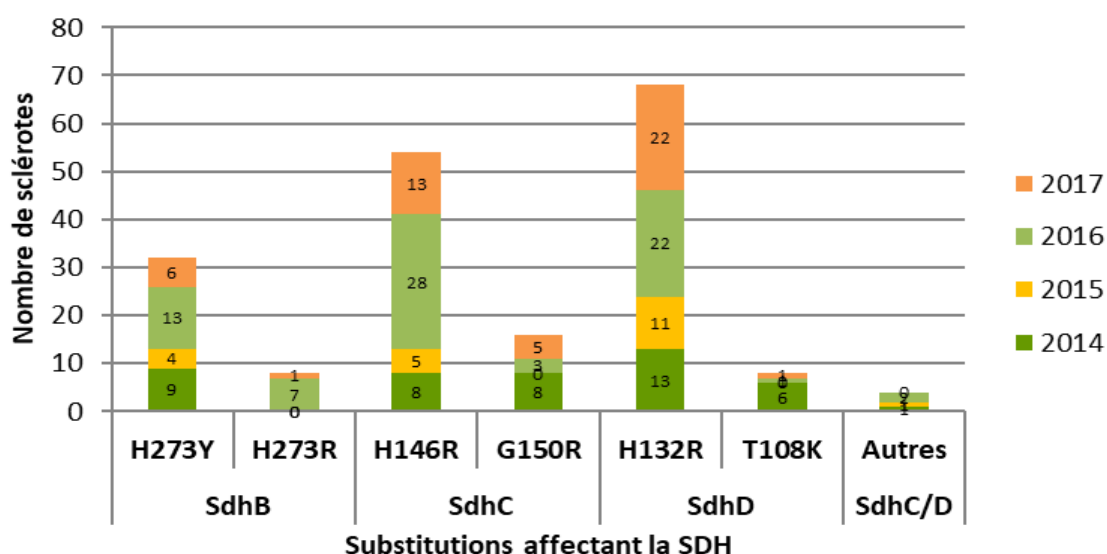


CARACTERISATION DES GENOTYPES RESISTANTS AUX SDHI

Le génotypage des 190 souches résistantes collectées depuis 2014 met en évidence que près de 80 % des mutations concernent les gènes codant pour les sous-unités C et D de la succinate déshydrogénase. Deux substitutions SdhD-H132R et SdhC-H146R sont prépondérantes et représentent respectivement 36% et 28% des mutations détectées. Les 4 autres substitutions analysées par HRM sont moins bien représentées dans cet échantillonnage (Figure 3). Quatre autres substitutions ont été caractérisées par séquençage, portant à 10 les substitutions mises en évidence chez *S. sclerotiorum*. A noter que tous les génotypes ne portaient qu'une seule de ces substitutions à la fois mais que plusieurs substitutions peuvent être détectées sur la même parcelle, au sein d'une même population.

Figure 3 : Effectif des différents génotypes corrélés à la résistance aux SDHI chez *S. sclerotiorum* (n=190).

Number of the various genotypes correlated with SDHI resistance in *S. sclerotiorum* (n=190).

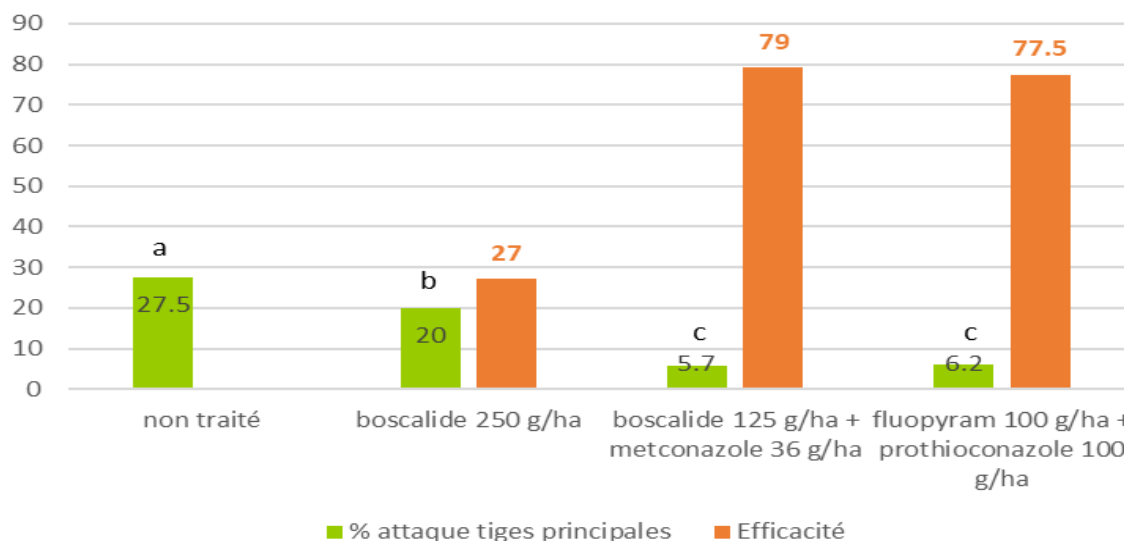


EFFICACITE PRATIQUE DES SPECIALITES FONGICIDES EN SITUATION DE RESISTANCE

En 2018, un seul des essais d'évaluation fongicide vis-à-vis du sclérotinia a été attaqué à hauteur de 27,5% de tiges principales atteintes dans le témoin non traité. Se situant dans un secteur où la résistance au boscalide est détectée depuis 2014, le traitement de référence, boscalide 250g/ha, avec 20% de tiges atteintes, présente une perte d'efficacité importante par rapport à celle attendue. Par contre, les associations de SDHI à demi dose avec un IDM à demi dose (telles que boscalide+metconazole ou fluopyram+prothioconazole), avec en moyenne 6% de tiges principales atteintes, offrent une efficacité de l'ordre de 80% et assurent encore un bon contrôle de la maladie.

Figure 4 : Taux d'attaque de sclérotinia sur tiges et efficacité des fongicides en situation de résistance au boscalide (nord du Cher, 2018).

Incidence of sclerotinia stem rot and efficacy of fungicides in situation of boscalid resistance (North of Cher, 2018).



DISCUSSION - CONCLUSION

Le plan de surveillance de la résistance du sclerotinia aux fongicides dans sa dimension de collecte de scléroties est tributaire des attaques qui, ces dernières années, se sont faites rares, souvent limitées à quelques microrégions sur le territoire. Du fait d'un nombre réduit de sites analysés, les résultats peuvent manquer de représentativité les années de très faible collecte.

Néanmoins, après une progression quasi exponentielle de la résistance aux SDHI chez *S. sclerotiorum* au cours des années 2012-14, il semble que cette progression se soit quelque peu ralentie et stabilisée, fluctuant entre 30% à 40% de sites avec au moins un sclérote (souche) résistant détecté.

En termes de mécanisme de résistance, il correspond à une altération de cible dans les trois des quatre sous-unités constitutives de la succinate déshydrogénase. Pour *S. sclerotiorum*, il est actuellement détecté une dizaine de génotypes résistants avec toutefois une prédominance de deux génotypes (SdhC-H146R et SdhD-H132R), déjà identifiés chez d'autres champignons pathogènes pour leur implication dans le déterminisme de la résistance (Avenot et al, 2009; Avenot et al. 2008). Pour les génotypes moins fréquents, un phénotypage d'un nombre représentatif d'isolats est en cours vis-à-vis des différentes classes chimiques de SDHI auxquelles appartiennent le fluopyram et l'isofétamide. Les premiers résultats indiquent l'existence de résistance croisée positive forte à modérée entre les différentes classes, ce qui amène à étendre le risque de résistance non plus au seul boscalide mais à l'ensemble des SDHI.

En termes de perte d'efficacité au champ, les sites de production où une érosion de l'efficacité d'un SDHI seul est observée restent rares. Cette situation relativement maîtrisée est le fruit d'une prise de conscience précoce du risque de résistance encouru avec le mode d'action SDHI et de préconisations de gestion de ce mode d'action. Les principes en sont rappelés chaque année dans une note commune Anses-INRA-Terres Inovia « Sclérotinia du colza ». Cette note fait aussi référence pour la délivrance des autorisations de mise sur le marché (AMM).

La gestion du risque commence par la lutte intégrée contre le sclérotinia : allongement des rotations trop courtes avec colza (succession de 2-3 cultures moins sensibles en s'appuyant sur la baisse naturelle du stock de scléroties), utilisation du produit de biocontrôle CONTANS WG pour réduire le potentiel infectieux après une forte attaque. En règle générale, plus l'efficacité d'une

solution ou d'un programme repose sur un mode d'action unisite et plus il y a un risque de favoriser la sélection de souches résistantes. Le risque est d'autant plus important que l'emploi est systématique et généralisé (exemple en rotations courtes). Il s'agit donc en toutes situations de limiter la fréquence à une application unique de SDHI/an et d'éviter l'emploi d'un fongicide à base de SDHI seul. Dans les situations à risque sclerotinia faible à modéré, toutes les solutions disponibles y compris les solutions de biocontrôle d'efficacité moindre conviennent. Dans les situations à risque sclerotinia fort (*retour fréquent du colza dans la rotation, historique d'attaques sévères...*), il est préconisé d'alterner les modes d'action au sein de la parcelle, les spécialités à base de prothioconazole ou de SDHI restent les plus efficaces. Mais dans les régions concernées par la résistance ou les parcelles avec résistance avérée, il convient de réaliser au moins une impasse SDHI sur colza (alternance par substitution). Dans les parcelles avec résistance avérée, il convient d'éviter les association SDHI + Qol (strobilurine). La résistance de l'un reporte toute la pression de sélection sur l'autre sachant que le risque de résistance est également considéré comme fort pour le mode d'action Qol (strobilurines dont l'azoxystrobine, la dimoxystrobine, etc...,) en raison de sa cible unisite. Ainsi, la mise en œuvre d'une restriction d'utilisation du produit seul au profit d'une stratégie d'association d'un SDHI avec d'autres modes d'action est une solution efficace qui a, semble t il, permis de ralentir la progression de la résistance SDHI avant qu'elle ne se généralise.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient chaleureusement les expérimentateurs ayant prélevées populations de sclérotés.

BIBLIOGRAPHIE

Anses - INRA - Terres Inovia, 2018 - Note commune : Gestion durable de la résistance aux fongicides utilisés contre la sclérotiniose du colza (*Sclerotinia sclerotiorum*)
<http://www.afpp.net/apps/accueil/autodefault.asp?d=5121>

Avenot, H. F., A. Sellam, G. Karaoglanidis, and T. J. Michailides. 2008. 'Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio', *Phytopathology*, 98: 736-42.

Avenot, H., A. Sellam, and T. Michailides. 2009. 'Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid', *Plant Pathology*, 58: 1134-43.

Penaud A., Wagner D., Makowski D., Ruck L., 2012 - Evaluation d'un indicateur de risqué en tant qu'outil d'aide à la décision d'une protection contre la sclérotiniose du colza. *AFPP*, 10^{ème} CIMATours, France.

Walker A.S., Auclair C., Rémuson F., Micoud A., Carpezat, Leflon M et Annette Penaud A., 2015 - Statut de la résistance aux SDHIs des populations françaises de *sclerotinia sclerotiorum* et caractérisation des souches résistantes. *AFPP*, 11^{ème} CIMA Tours, France.