

## RÉSISTANCE *IN VITRO* DE *BOTRYTIS CINEREA* À TROIS FONGICIDES (\*)

*Ahlem HAMDACHE* <sup>(1)</sup>, *Ahmed LAMARTI* <sup>(1)</sup>, *Alain BADO*C <sup>(2)</sup>

*Trois fongicides fréquemment utilisés dans les champs de Fraisier ont été testés in vitro contre une souche de Botrytis cinerea isolée de fraises. L'azoxystrobine est inefficace sur la germination, la croissance et la sporulation. Le fénarimol est moyennement efficace sur la croissance et la sporulation et sans aucune efficacité sur la germination ( $CI_{50} > \text{dose homologuée}$  ;  $CI_{90} > 2 \text{ dose homologuée}$ ). La combinaison chlorothalonil-carbendazime est très efficace sur la germination et la sporulation ( $CI_{50} < 1/4 \text{ dose homologuée}$  ;  $CI_{90} < \text{dose homologuée}$ ), et moyennement efficace sur la croissance.*

### INTRODUCTION

Le champignon pathogène *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. a un large spectre de plantes hôtes et préfère les plantes riches en pectines [21]. Ainsi, il favorise chez le Fraisier une pourriture grise qui attaque les parties aériennes : pédicelles, fleurs et fruits immatures et matures [11]. Toutefois, seuls les dégâts situés sur le fruit sont considérés comme graves [16]. Les

---

(\*) *Manuscrit reçu le 20 septembre 2008.*

(1) *Equipe de Biotechnologie Végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences de l'Université Abdelmalek Essaâdi, BP 2121, 93002 Tétouan, Maroc. biotec99@hotmail.com*

(2) *GESVAB-EA 3675, Faculté des Sciences pharmaceutiques, Université Bordeaux Segalen, ISVV, 210 Chemin de Leysotte, CS 50008, 33882 Villenave-d'Ornon. alain.badoc@u-bordeaux2.fr*

principales sources d'inoculum de la maladie chez le Fraisier sont les feuilles mortes, les fruits malades et les mauvaises herbes voisines [19].

L'application de fongicides durant la floraison est la méthode de contrôle la plus fréquente dans la culture du Fraisier [9,11].

On a d'abord utilisé des benzimidazolés. Le Teldor, homologué au Maroc, en fait partie et est à base de carbendazime [13]. Puis, vers la fin des années 1980, on a employé des dicarboximides [18]. La vinclozoline, fongicide dicarboximide, a un effet inhibiteur sur la croissance hyphale et réduit la longueur du tube germinatif du quart [4].

Le contrôle de la pourriture grise est cependant limité à cause du développement de la résistance multiple de *B. cinerea* aux benzimidazolés et aux dicarboximides [6] ainsi qu'au fenhexamide [7]. Différents groupes de fongicides (benzimidazole, dicarboximide, phénylpyrrole, hydroxyanilide and anilinopyrimidine) ont été testés sur 55 isolats de *Botrytis cinerea*, obtenus de différents champs de culture sous serre, confirmant la résistance de *Botrytis cinerea* aux dicarboximides et aux benzimidazolés [14].

La présence de résidus chimiques et le développement de souches résistantes ont conduit à rechercher des alternatives efficaces et économiquement viables [23], comme le contrôle biologique à l'aide d'agents microbiens antagonistes [23].

Dans le présent travail, trois fongicides régulièrement utilisés au Maroc contre les maladies cryptogamiques du Fraisier ont été évalués *in vitro* sur *Botrytis cinerea*.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Souche fongique

Des fraises présentant les symptômes de la pourriture grise ont été collectées dans des champs de fraisiers de la région de Loukkous au Nord du Maroc.

Des isolats de *Botrytis cinerea* ont été obtenus de fraises 'Camarossa' ou 'Ventana'. Ils ont été cultivés sur milieu PDA [Potato Dextrose Agar] 7 à 10 jours à 25°C à l'obscurité, purifiés par plusieurs

repiquages et identifiés sous microscope optique à l'aide de clés de détermination [2,17]. L'isolat Bt5 provenant de la variété 'Camarosa' a été retenu.

Une suspension de spores issue de conidies a été utilisée pour l'étude de la germination. Des disques mycéliens de 5 mm de diamètre provenant de cultures de dix jours ont été agités au vortex dans un tube contenant 2 ml d'eau et 0,05 ml de Tween 80 [8]. La suspension est filtrée à travers une gaze de nylon (diamètre des pores 102  $\mu$ m) et diluée à l'eau distillée stérile de manière à obtenir 10 000 spores/ml par un comptage sur cellule de Malassez sous microscope optique au grossissement x 400. Pour chacune des trois répétitions, on utilise de nouveaux disques mycéliens.

### Fongicides testés

Trois fongicides, appartenant à différentes familles chimiques (Tableau I) et utilisés pour lutter contre les maladies cryptogamiques du Fraisier au Maroc ont été testés au laboratoire sur la germination, la croissance et la sporulation du champignon à des doses proches de la dose homologuée (DH).

**Tableau I :**  
**Caractéristiques des trois fongicides testés.**

Nom commercial	Matière active	g/l	Famille	Mode d'action	Dose homologuée (cc/hl)	Doses testées ( $\mu$ l/100 ml)
Ortiva	azoxystrobine	250	strobilurines	systemique, préventif et curatif	50	25 50 75 100
Rubigan	fénarimol	120	pyrimidines	systemique	25	15 25 35
Banko plus	chlorothalonil carbendazime	500 100	chloronitriles benzimidazolés	contact-préventif systemique-curatif	200	50 100 200 250

### **Effet sur la germination des conidies**

Les différentes doses testées de fongicides, solubilisées dans 10 ml d'eau distillée stérile, ont été ajoutées à 90 ml de solution gélosée (1,5 g d'agar dans 100 ml d'eau distillée) encore en fusion puis versés à raison de 15 ml dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre. Les surfaces gélosées ont été inoculées par trois gouttes de suspension conidiale. Après 24 heures d'incubation à 25°C à l'obscurité, le comptage de conidies germées a été réalisé au microscope optique sur 100 conidies. Deux boîtes ont été utilisées pour chaque concentration avec trois répétitions.

### **Effet sur la croissance mycélienne**

Les différentes doses de fongicides, solubilisées dans 10 ml d'eau distillée stérile, ont été ajoutées à 90 ml de PDA encore en fusion. 15 ml de milieu ont été coulés dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre. Elles ont été inoculées par trois disques mycéliens issus de cultures âgées de dix jours. Après dix jours d'incubation à 25°C à l'obscurité, la croissance des colonies a été évaluée par la moyenne de deux diamètres perpendiculaires. Deux boîtes ont été utilisées pour chaque concentration avec trois répétitions.

### **Effet sur la sporulation**

Trois disques mycéliens de 5 mm de diamètre tirés de trois boîtes de Petri ayant servi pour la croissance et âgés de dix jours ont été placés dans un tube contenant 1 ml d'eau. Après agitation au vortex et filtration à l'aide d'une gaze de nylon (102  $\mu$ m), trois comptages par suspension ont été réalisés sur 1 ml à l'aide d'une cellule de Malassez. L'expérience est répétée trois fois.

### **Efficacité des fongicides**

Le pourcentage d'inhibition des fongicides a été évalué selon la formule suivante :

$$E (\%) = \frac{X - X_i}{X} \times 100$$

$X$  : Estimation de la germination, croissance ou sporulation en absence de fongicide.

$X_i$  : Estimation de la germination, croissance ou sporulation en présence d'un fongicide.

Les  $CI_{50}$  et les  $CI_{90}$  ont été déterminés graphiquement par la relation linéaire entre le logarithme des concentrations et les pourcentages d'inhibition de la germination, la croissance et la sporulation.

L'analyse statistique des résultats a été réalisée par le test « Duncan's multiple range » au seuil de 5 %.

## RÉSULTATS

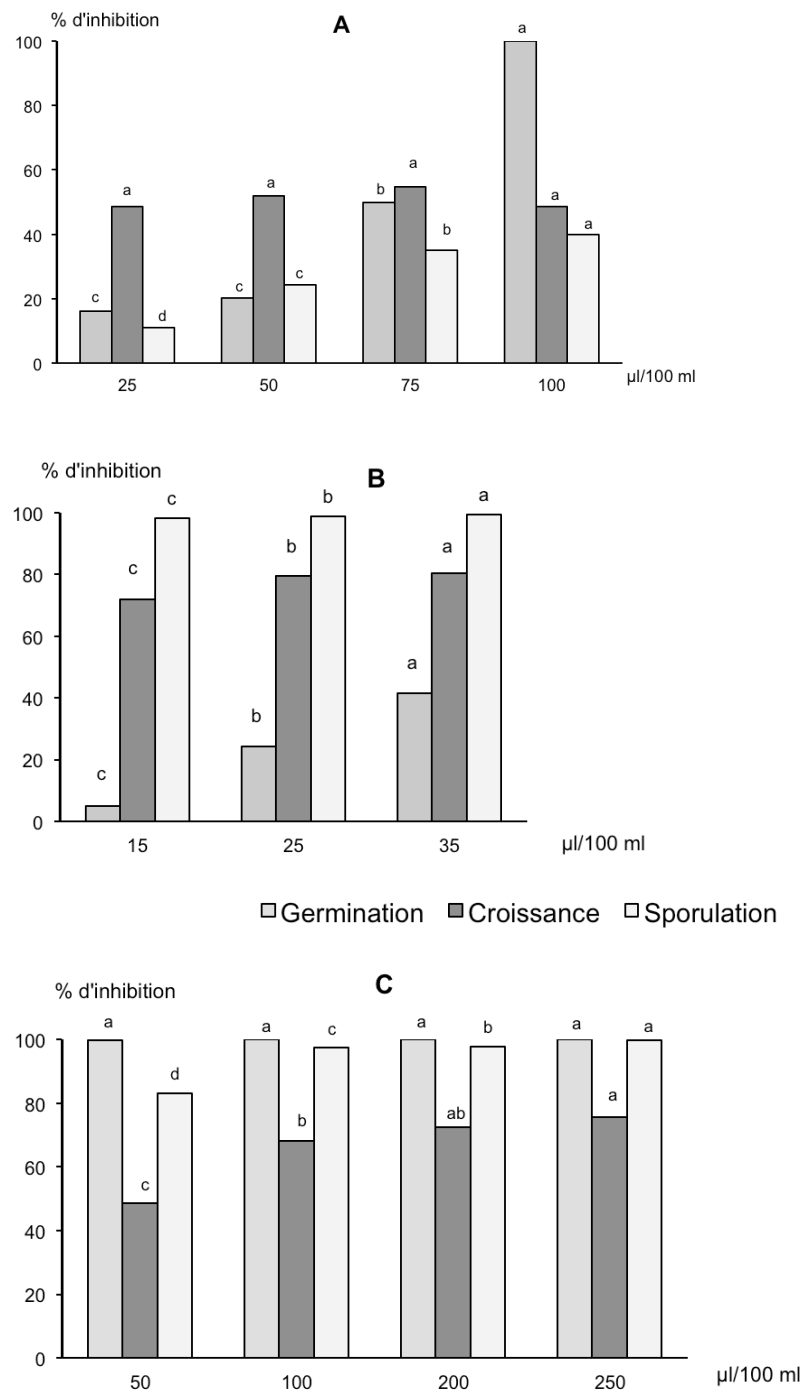
### **Efficacité des fongicides**

Les fongicides testés ont montré différents degrés d'efficacité sur les trois stades de vie de *Botrytis cinerea*.

L'azoxystrobine a peu d'effet notamment sur la sporulation (Figure 1A). À deux fois la dose homologuée, on constate une efficacité sur la germination. L'absence de différence significative entre les doses testées pour la croissance confirme la résistance de *Botrytis cinerea* vis-à-vis de ce fongicide.

Le fénarimol est très efficace à toutes les concentrations testées sur la sporulation et très faiblement sur la germination (Figure 1B).

La combinaison chlorothalonil-carbendazime est fortement efficace sur la germination et la sporulation et moyennement efficace sur la croissance (Figure 1C).



*Fig. 1 : Effet de de l'azoxystrobine (A), du fénarimol (B) et de l'association chlorothalonil-carbendazime (C) in vitro sur trois stades de vie de Botrytis cinerea. Pour un même fongicide et stade de vie, des lettres identiques indiquent qu'il n'y a pas de différence significative au seuil de 5 %.*

### Concentrations inhibitrices des fongicides

L'azoxystrobine n'inhibe pas la germination conidienne ( $CI_{50}$  et  $CI_{90} > DH$ ) et le fénarimol est inefficace sur la germination de *Botrytis cinerea* ( $CI_{50}$  et  $CI_{90} > 2 DH$ ) (Tableau II). Par contre, l'association chlorothalonil-carbendazime supprime presque totalement la germination ( $CI_{50} < \frac{1}{4} DH$ ).

La croissance mycélienne n'est pas totalement inhibée par les trois fongicides. Un développement mycélien est observé à différents degrés en présence de toutes les concentrations. Le fénarimol est le plus actif sur la croissance ( $CI_{50} < \frac{1}{4} DH$  et  $CI_{90} > DH$ ) alors que les deux autres fongicides sont moyennement efficaces ( $CI_{50} < DH$  et  $CI_{90} > DH$ ).

L'azoxystrobine n'a pas d'effet sur la sporulation ( $CI_{50}$  et  $CI_{90} > 2DH$ ), contrairement au fénarimol et à la combinaison chlorothalonil-carbendazime très efficaces ( $CI_{50} < \frac{1}{4} DH$  et  $CI_{90} < DH$ ).

**Tableau II :**  
 **$CI_{50}$  et  $CI_{90}$  de trois fongicides agissant sur la germination, la croissance et la sporulation *in vitro* de *Botrytis cinerea*.**

	Azoxystrobine (Ortiva)		Fénarimol (Rubigan)		Chlorothalonil- carbendazime (Banko plus)	
	$CI_{50}$	$CI_{90}$	$CI_{50}$	$CI_{90}$	$CI_{50}$	$CI_{90}$
Germination	>DH	>DH	>DH	> 2DH	< $\frac{1}{4}$ DH	< DH
Croissance	< DH	> DH	< $\frac{1}{4}$ DH	> DH	< DH	> DH
Sporulation	> 2DH	> 2DH	< $\frac{1}{4}$ DH	< DH	< $\frac{1}{4}$ DH	< DH

### Résistance du champignon aux fongicides à la DH

*Botrytis cinerea* est résistant à l'azoxystrobine à la dose homologuée surtout pour la germination et la sporulation (Tableau III). Il est résistant au fénarimol pour la germination et sensible pour la croissance et la sporulation. Il est sensible pendant les trois phases de son développement (inhibition > 50 %) au chlorothalonil-carbendazime, surtout pour la germination et la sporulation.

**Tableau III :**  
**Comparaison des moyennes d'inhibition de trois fongicides à la dose homologuée sur trois stades de développement *in vitro* de *Botrytis cinerea*.**

Fongicide	Germination	Croissance	Sporulation
Azoxystrobine 50 $\mu$ l/100 ml (Ortiva)	20 b	52 b	24 b
Fénarimol 25 $\mu$ l/100 ml (Rubigan)	24 b	80 a	99 a
Chlorothalonil-carbendazime 200 $\mu$ l/100 ml (Banko plus)	100 a	72 a	98 a

Sur une même colonne deux valeurs suivies d'une même lettre ne présentent pas une différence significative au seuil de 5 %.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

L'azoxystrobine n'a eu aucune efficacité sur tous les stades de vie de la souche de *Botrytis cinerea* aux doses homologuées. On peut penser que l'utilisation répétée de ce fongicide est à l'origine de l'apparition de cette résistance. À deux fois la dose homologuée, l'azoxystrobine reste encore efficace sur la germination, mais il n'est pas souhaitable d'utiliser de fortes concentrations. En effet, les fongicides, censés contrôler les champignons pathogènes par leurs propriétés biocides, peuvent être toxiques à d'autres formes de vie dans les écosystèmes terrestre et aquatique (microorganismes, oiseaux, abeilles...). Ils deviennent des polluants environnementaux potentiellement toxiques pour le consommateur par les résidus toxiques sur les fruits. D'après notre étude, l'utilisation de l'azoxystrobine seule est à éviter et ne ferait qu'augmenter la résistance du champignon.

Le fénarimol s'est avéré efficace contre la sporulation de la souche de *Botrytis cinerea*, mais non contre sa germination et moyennement contre sa croissance. Utilisé seul, ce fongicide risque de ne pas pouvoir contrôler la pourriture grise et de favoriser des résistances.

L'association chlorothalonil-carbendazime permet de contrôler la souche et est très efficace sur sa sporulation.



Le chlorothalonil a une activité multisite et de ce fait est moins exposé à la résistance [10]. Il est efficace lorsqu'il est utilisé en combinaison avec d'autres fongicides [3]. En combinaison avec le chlorpyrifos, une concentration d'autant plus élevée de chlorothalonil augmente l'inhibition d'une population de microorganismes du sol [5]. Il agit sur les processus respiratoires [1]. L'efficacité du chlorothalonil sur la sporulation de *Botrytis cinerea* est signalée par Sutton et Peng [20].

Le carbendazime appartient aux benzimidazolés, dont l'efficacité à contrôler *Botrytis cinerea* a été réduite à cause du développement de hauts niveaux de résistance [24]. L'inefficacité de cette famille d'antifongiques a été également observée pour d'autres champignons pathogènes tels *Alternaria alternata* et *Penicillium expansum* [12]. Le carbendazime agit par inhibition du tube germinatif et perturbation des divisions cellulaires [15].

La combinaison chlorothalonil-carbendazime semble encore efficace pour lutter contre la pourriture grise du Fraisier, et peut continuer à être utilisée, même s'il est préférable de se tourner vers des traitements moins polluants.

## RÉFÉRENCES

- 1 - Aubertot (J.N.), Barbier (J.M.), Carpentier (A.), Gril (J.J.), Guichard (L.), Lucas (P.), Savary (S.), Savini (I.), Voltz (M.) (Eds.), Pesticides, agriculture et environnement : réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'Expertise scientifique collective, INRA et Cemagref (France). 2005, 119 p.
- 2 - Botton (B.), Breton (A.), Fèvre (M.), Gauthier (S.), Guy (P.), Larpent (J.P.), Reymond (P.), Sanglier (J.J.), Vayssier (Y.), Veau (P.) - *Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle*. 2e éd. rev. et compl. Paris, Milan, Barcelone : Masson, 1990, 512 p.
- 3 - Brunelli (A.), Collina (M.) - La difesa del melone dalla peronospora. [The control of *Peronospora on melon*.] - *Colt. Prot.*, 1996, **25**(12), 107-108.
- 4 - Cabral (S.M.J.C.S.), Cabral (J.P.S.) - Morphological and chemical alterations in *Botrytis cinerea* exposed to the dicarboximide fungicide vinclozolin. - *Can. J. Microbiol.*, 1997, **43**(6), 552-560.

- 5 - Chu (X.), Fang (H.), Pan (X.), Wang (X.), Shan (M.), Feng (B.), Yu (Y.) - Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial populations. - *J. Environ. Sci.*, 2008, **20**(4), 464-469.
- 6 - Elad (Y.), Gullino (M.L.), Shtienberg (D.), Aloï (C.) - Managing *Botrytis cinerea* on tomatoes in greenhouses in the Mediterranean. - *Crop Prot.*, 1995, **14**(2), 105-109.
- 7 - Esterio (M.), Auger (J.), Ramos (C.), García (H.) - First report of fenhexamid resistant isolates of *Botrytis cinerea* on grapevine in Chile. - *Plant Dis.*, 2007, **91**(6), 768.
- 8 - Guetsky (R.), Shtienberg (D.), Elad (Y.), Dinooor (A.) - Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. - *Phytopathology*, 2001, **91**(7), 621-627. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO.2001.91.7.621>
- 9 - Lerceteau-Köhler (E.), Guérin (G.), Moing (A.), Renaud (C.), Roudeillac (P.), Laigret (F.), Denoys-Rothan (B.) - Analyse du génome du fraisier cultivé octoploïde. - *12e Colloq. Rech. Fruit. Bordeaux*, 30-31 Mai 2002. <http://commonweb.unifr.ch/biol/pub/mauchgroup/parisy/fragaria.pdf>.
- 10 - Leroux (P.) - Prévoir, une résistance peut en cacher une autre. - *Perspect. Agric.*, 1993, (185), 95-98.
- 11 - Maas (J.L.) - *Compendium of strawberry diseases*. St. Paul, MN, USA: The American Phytopathological Society, 1984, 138 p.
- 12 - Maouni (A.), Lamarti (A.), Douira (A.), Badoc (A.) - Étude de la résistance d'*Alternaria alternata* et de *Penicillium expansum* aux fongicides lors de la conservation des poires. - *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2002, **141**(1-4), 61-72.
- 13 - Mosaid (A.) - *Lutte chimique et potentielle de résidus sur fraisier dans la région du Gharb*. Thèse 3<sup>e</sup> Cycle Inst. Agron. Vet. Hassan II Rabat, Maroc, 2001, 100 p.
- 14 - Myresiotis (C.K.), Karaoglanidis (G.S.), Tzavella (K.) - Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. - *Plant Dis.*, 2007, **91**(4), 407-413.

- 15 - Richmond (D.V.), Phillips (A.) - The effect of benomyl and carbendazim on mitosis in hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. and roots of *Allium cepa* L. - *Pesticide Biochem. Physiol.*, 1975, **5**(4), 367-379.
- 16 - Roudeillac (P.) - *La fraise : techniques de production*. Document CTIFL, 1987, 384 p.
- 17 - Samson (R.A.), Hoekstra (E.S), Oorschot (C.A.N. Van) - *Introduction to food-borne fungi*. 2nd ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, BAARN. Institute of the Royal Netherlands, Academy of Arts and Sciences, 1984, 248 p.
- 18 - Stehmann (C.), De Waard (M.A.) - Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* to triazoles, benomyl and vinclozolin. - *Eur. J. Plant Pathol.*, 1996, **102**(2), 171-180.
- 19 - Sutton (J.C.) - Evaluation of microorganisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. - *Adv. Plant Pathol.*, 1995, **11**, 173-190.
- 20 - Sutton (J.C.), Peng (G.) - Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. - *Phytopathology*, 1993, **83**(6), 615-621. [http://www.apsnet.org/phyto/PDFS/1993/Phyto83n06\\_615.pdf](http://www.apsnet.org/phyto/PDFS/1993/Phyto83n06_615.pdf)
- 21 - Ten Have (A.) - *The Botrytis cinerea endopolygalacturonase gene family*. Thesis, Wageningen Univ., The Netherlands, 2000, 119 p. <http://edepot.wur.nl/121240>
- 22 - Wilson (C.L.), El-Ghaouth (A.) - Multifaceted biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *In Pest management: Biologically Based Technologies*. Lumsden (R.D.), Vaughn (J.L.) (Eds.) Washington DC.: American Chemical Society Press, 1993, p. 181-185.
- 23 - Wilson (C.L.), Wisniewski (M.E.), Eds. - *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables*. - Theory and practice. Boca Raton, FL.: CRC Press, 1994.
- 24 - Yourman (L.F.), Jeffers (S.N.), Dean (R.A.) - Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. - *Phytopathology*, 2001, **91**(3), 307-315. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.2001.91.3.307>

## ABSTRACT

### **The *in vitro* resistance of *Botrytis cinerea* to three fungicides**

Three fungicides frequently used in strawberry fields were tested *in vitro* against a *Botrytis cinerea* strain isolated from strawberries. Azoxystrobin was ineffective on seeding, growth and sporulation. Fenarimol was moderately effective on growth and sporulation but ineffective on seeding ( $CI_{50} > \text{approved dose}$ ;  $CI_{90} > 2 \text{ measures approved}$ ). The chlorothalonil-carbendazime combination was very effective on seeding and sporulation ( $CI_{50} < 1/4 \text{ measures approved}$ ;  $CI_{90} < \text{approved dose}$ ), and moderately effective on growth.

**Key-words:** *Botrytis cinerea*, fungicides, germination, growth, resistance, sporulation.

---