



HAL
open science

Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides

Sakhr Ajouz

► **To cite this version:**

Sakhr Ajouz. Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Sciences agricoles. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 2009. Français. NNT : . tel-02823602

HAL Id: tel-02823602

<https://hal.inrae.fr/tel-02823602>

Submitted on 6 Jun 2020

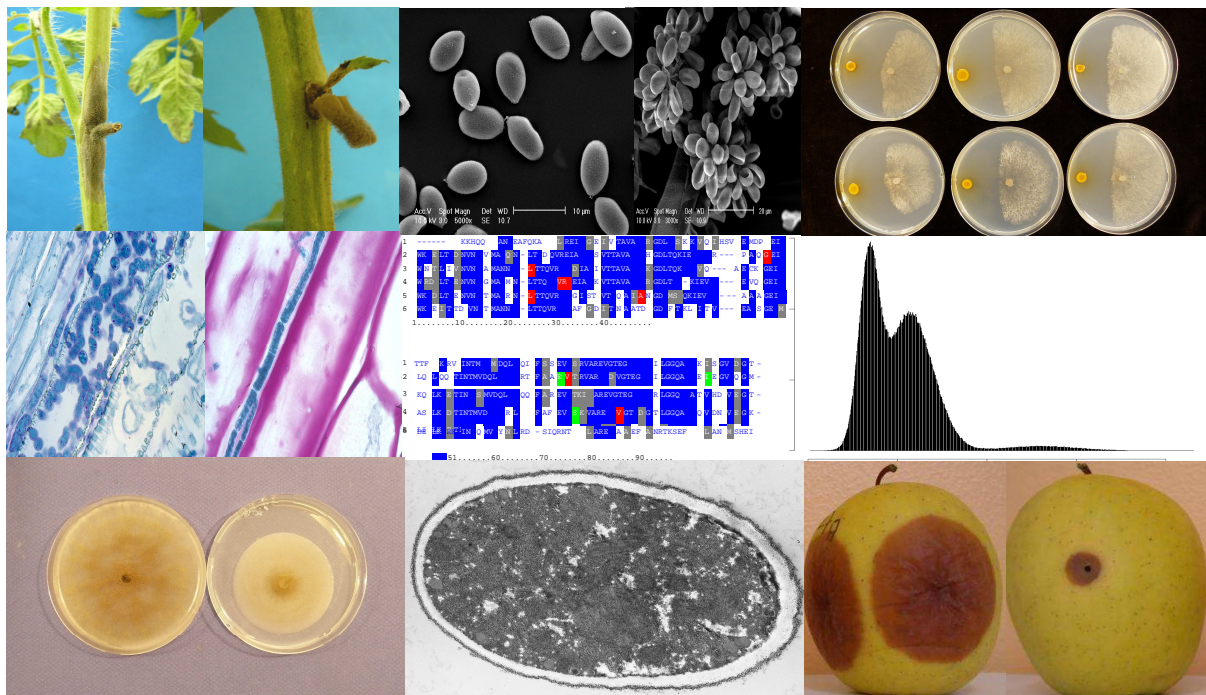
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE
VAUCLUSE
Faculté des Sciences



Présentée et soutenue publiquement
par

Sakhr AJOUZ

Le 21 décembre 2009

devant la commission d'examen:

Sabine Fillinger, Chargé de recherche, INRA-AgroParisTech

Claude Alabouvette, Directeur de Recherche, INRA-Dijon

Miguel Lopez-Ferber, Professeur Ecole des Mines d'Alès

Mohamed El Maataoui, Professeur Université d'Avignon

Marc Bardin, Chargé de recherche, INRA-Avignon

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Remerciements

Ce n'est pas évident d'exprimer en quelques lignes ma gratitude à toutes les personnes qui ont participé au bon déroulement et à l'aboutissement de mon travail de thèse. Voici une petite liste de ces personnes en sachant qu'il en existe d'autres qui restent cachées derrière chaque mot de ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement Philippe Nicot pour m'avoir accueilli dans l'unité de Pathologie Végétale-Laboratoire Mycologie. Merci également à Cindy Morris pour m'avoir renouvelé sa confiance après avoir pris la direction de l'unité.

Je remercie vivement Marc Bardin et Mohamed El Mataâoui pour m'avoir encadré durant cette thèse. Je les remercie chaleureusement pour leur soutien sans faille dans les nombreuses difficultés que j'ai pu rencontrer, soutien sans lequel bien peu de choses auraient été rendues possibles. Leurs disponibilités et leurs généreux secours au cours de certains de mes moments difficiles ont été d'une très grande qualité, et d'un immense réconfort. Comment également ne pas évoquer ici nos nombreuses discussions ainsi que les nombreux conseils qu'ils m'ont donnés; merci infiniment Marc Bardin et Mohamed El Mataaoui.

Dans tout ce que j'ai pu souffrir et obtenir, elle a été l'autre moi. Elle est d'une très grande importance dans ma vie, m'accompagne et me soutient tout le temps par la force et l'énergie qui lui sont disponibles. Il s'agit de Naghoum, ma merveilleuse, splendide épouse, dont je ne peux mesurer tout l'apport dans l'accomplissement de cette formation. Je te remercie infiniment ma chérie.

Je tiens à remercier Claude Alabouvette et Miguel Lopez-Ferber pour avoir accepté de juger ce travail, ainsi que Benoit Sauphanor, membre de mon comité de thèse.

Je remercie du fond du cœur Claire Troulet, Gisèle Riqueau, Véronique Decognet, Christel Leyronas, Dominique Andurand, Magali Duffaud et François Orny pour leurs collaborations, leurs précieuses aides, leur disponibilité et leur sympathie. Merci à l'ensemble de l'équipe de mycologie, stagiaires et permanents, pour son accueil.

Merci aussi à Pierre Leroux, Sabine Fillinger, Anne-Sophie Walker et Johann Confais pour les travaux que nous avons menés ensemble et l'ambiance dans laquelle ils se sont déroulés. Merci à l'ensemble de l'équipe de Versailles pour son accueil durant mes séjours là bas.

Tout ceci n'aurait pas eu la même saveur sans Mauricette ma prof de français 'familier', Frédéric professeur de proverbes français, Pascale, Claudine, Michel, Hélène, Isabelle, Marie-Jeanne, René, Jean-Pierre, Magali, Laurent, Frédéric et l'ensemble de l'équipe culture pour

lesquels j'exprime toute ma sympathie, ainsi qu'à tous les membres de l'unité de Pathologie Végétale-INRA d'Avignon.

Je pense aussi ici à Alain Buffière et André Moretti pour la toujours excellente humeur dans laquelle ils nous baignent à chaque nouvelle rencontre méditerranéenne et provençale.

Mes remerciements chaleureux vont à mes chers parents, mes frères et sœurs grâce à qui, entre autre, je suis aujourd'hui arrivé à cette étape capitale et décisive de ma courte vie.

Mes remerciements vont également à mon pays, la Syrie, qui m'a permis de terminer cette formation, en me fournissant les ressources nécessaires disponibles. Que tous ceux qui ont contribué à faciliter cette étude dans ce cadre trouvent ici le témoignage de ma sincère gratitude. Un grand merci également à tous les membres de l'ambassade de Syrie à Paris, et en particulier à Mlles Mazina et Mourshida du ministère de l'enseignement supérieur en Syrie, pour leur disponibilité, sympathie et aide. Je remercie également M. Mohamed Tawil de l'Université de Tishreen (Lattaquié-Syrie), Mmes Hélène Maisonneuve du CROUS d'Avignon et Sophie Bochet du CROUS d'Aix Marseille, pour leur aide et leur sympathie.

De plus, mes remerciements seront incomplets si je ne fais pas mention de mes amis, Pierre, Sujit, Zohir, Kousai, June, Geoffray, Abed, Roula, Rani, Nouhad, Jonathan, Ali, Jihad, Benoit, Somaya, Josselin, Ibtessem, Amir, Moudar, François, Faten, Barah, Abed, Sahfouan, Zakoian Béranger, Juliette, Tamam, Mouthana, Boushra, Iline, Jamil, Siham, Charlotte, Hana, Hend, Mekki, Karime, Fabien, Leisbeth, Wangyour, Marie-Laure, Rachid, Zhang, Fuping, Manzoor, Daouda, Patricio pour m'avoir supporté, encouragé et soutenu.

Merci à tous.

Liste des publications et communications

Chapitre I - Synthèse Bibliographique	1
1. <i>Botrytis cinerea</i> , agent de la pourriture grise	3
1.1. Position taxonomique	3
1.2. Gamme d'hôte	5
1.3. Importance économique de la maladie	5
1.4. Cycle de développement de la pourriture grise	7
1.5. Facteurs influençant le développement du champignon	9
1.5.1. Exigences nutritives	11
1.5.2. Etat physiologique de la plante	11
1.5.3. Facteurs climatiques	12
1.5.4. Qualité de la lumière	13
1.6. Diversité phénotypique et génétique de <i>B. cinerea</i>	14
1.6.1. Morphotypes	14
1.6.2. Sensibilité à la qualité de la lumière : capacité à produire des conidies	15
1.6.3. Agressivité sur plante	15
1.6.4. Exigence nutritive	15
1.6.5. Sensibilité aux fongicides	15
1.6.6. Diversité génétique	17
2. Stratégies de protection des plantes contre <i>B. cinerea</i>	18
2.1. Lutte chimique	19
2.2. Méthodes prophylactiques	21
2.3. Protection biologique	22
2.3.1. De nombreux agents de lutte biologique décrits	23
2.3.1.1. Composés minéraux et organiques	23
2.3.1.2. Extraits de plantes	24
2.3.1.3. Agents microbiens	26
2.3.2. Mode d'action des agents de lutte biologique	27
2.3.2.1. Antibiose	27
2.3.2.2. Hyperparasitisme	30
2.3.2.3. Compétition nutritive	30
2.3.2.4. Interférence avec le pouvoir pathogène	31
2.3.2.5. Modification des propriétés de surface des feuilles de la plante	32
2.3.2.6. Stimulation des mécanismes de défense de la plante	32
2.3.2.7. Combinaison de mécanismes d'action	33
2.3.3. Produits commercialisés	35
2.3.4. Facteurs d'efficacité de la lutte biologique contre <i>B. cinerea</i>	36
2.3.4.1. Contexte environnemental rencontré	36
2.3.4.2. Qualité du produit biologique	37
2.3.4.3. Variabilité naturelle de l'agent pathogène <i>B. cinerea</i>	39

3.	Durabilité des méthodes de contrôle de <i>B. cinerea</i>	41
3.1.	Définition de la durabilité	41
3.2.	Résistance de <i>B. cinerea</i> aux fongicides	41
3.3.	Résistance aux phytoanticipines et phytoalexines	42
3.4.	Adaptation aux films photosélectifs	43
3.5.	Résistance à des antagonistes bactériens produisant des antibiotiques	44
4.	Pertes d'efficacité de la protection biologique	45
4.1.	Protection contre les ravageurs invertébrés	45
4.2.	Protection contre les agents phytopathogènes	46
5.	Objectifs de l'étude	51
5.1.	Situation du sujet	51
5.2.	Objectifs des travaux réalisés	52
Chapitre II -	Évaluation de la diversité de la sensibilité de <i>Botrytis cinerea</i> à la pyrrolnitrine, antibiotique produit par divers agents de lutte biologique	55
Chapitre III -	Adaptation de <i>Botrytis cinerea</i> à la pyrrolnitrine et coûts associés à cette adaptation	79
Chapitre IV -	Comparaison du développement <i>in vitro</i> et <i>in planta</i> d'un mutant de <i>Botrytis cinerea</i> résistant à la pyrrolnitrine et de sa souche mère sensible	107
Chapitre V -	Comparaison du déterminisme génétique de la résistance de <i>Botrytis cinerea</i> à la pyrrolnitrine et à l'iprodione	127
Chapitre VI -	Stabilité des marqueurs microsatellites chez <i>Botrytis cinerea</i> après exposition à différentes pressions de sélection	151
	Conclusion générale	165
	Perspectives	173
	Références bibliographiques	179

Liste des publications et communications

Publication dans revue scientifique à comité de lecture:

Ajouz, S., Nicot, P.C. and Bardin, M. 2009. Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. Plant Pathology. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.022330.x

Manuscrits soumis dans des revues scientifiques à comité de lecture:

Ajouz, S., Bardin, M., Nicot, P. C and El Maâtaoui, M. Comparison of the development *in vitro* and *in planta* of a pyrrolnitrin-resistant mutant of *Botrytis cinerea* and its sensitive wild-type parent isolate. Soumis à European Journal of Plant Pathology en novembre 2009.

Ajouz, S., Decognet, V., Nicot, P. C and Bardin, M. Microsatellite stability in the plant pathogen *Botrytis cinerea* after exposure to different selective pressures. Soumis à Mycological Research en novembre 2009.

Communication à des congrès:

Ajouz, S., Bardin, M. and Nicot, P. C. 2007. Evolution of resistance of *Botrytis cinerea* to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological control agents. XIVth International *Botrytis* symposium : 2007/10/21-26, Cape Town (Afrique du Sud). Abstracts book. p. 95. (Poster)

Ajouz, S., Bardin, M. and Nicot, P. C. 2008. Evolution of resistance of *Botrytis cinerea* to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological control agents. 9th International congress of plant pathology : 2008/08/24-29, Torino, Italy. (Poster)

Ajouz, S., Bardin, M., Troulet, C., Riqueau, G., Nicot, P. C. 2008. Adaptation de *Botrytis cinerea* à la pyrrolnitrine, antibiotique produit par des agents de lutte biologique. 7^{èmes} Rencontres de Phytopathologie/Mycologie : 2008/01/20-24, Aussois, France. (Communication orale)

Ajouz, S., Bardin, M., Troulet, C., Riqueau, G., Decognet, V., Leyronas, C., Walker, A-S., Leroux, P., and Nicot, P. C. 2009. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by several biological agents. IOBC/wprs bulletin 49. 51-56. Congrès OILB 2009/09/6-11, Crète, Grèce. (Communication orale)

Chapitre I

Synthèse bibliographique

À la frontière du saprophytisme et du parasitisme, le champignon phytopathogène ubiquiste *Botrytis cinerea*, responsable de la pourriture grise, est un microorganisme polyphage qui cause d'énormes dégâts en agriculture. La maladie causée par cet agent pathogène est économiquement redoutable et importante car ce champignon attaque plus de 230 espèces de plantes. Sur cultures maraîchères, viticoles et horticoles, en pré- ou en post-récolte, cette maladie conduit à des pertes importantes de rendement.

Depuis quelques années, la protection biologique connaît un regain d'intérêt, alimenté par le souci croissant d'une meilleure protection de l'environnement, et par le désir de qualité des produits imposée par les consommateurs. L'utilisation d'agents de lutte biologique est devenue une réalité en agriculture en particulier pour le contrôle des ravageurs invertébrés, avec l'emploi d'insectes prédateurs, de parasitoïdes, de micro-organismes antagonistes, d'extraits de plantes, etc. La protection biologique contre les maladies des plantes est moins avancée mais a toutefois abouti à la commercialisation de quelques produits. Aux Etats-Unis, l'agence pour la protection de l'environnement (Environmental Protection Agency) a par exemple autorisé la commercialisation de 32 bactéries (14 fongicides, 2 bactéricides, 16 insecticides), 17 champignons (8 fongicides, 4 herbicides, 5 insecticides) et 8 virus (principalement des insecticides, voir <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/>). Dans l'Union européenne, la commercialisation est organisée par la Direction de la Protection de la santé des consommateurs. Elle est réglementée par la directive 91/414/CEE, qui a été modifiée spécifiquement pour les biopesticides par la directive 2001/36/CE. En 2003, seulement neuf pesticides microbiens dont deux bactéries (fongicides), six champignons (deux insecticides, quatre fongicides) et un virus (insecticide) ont été intégrés à l'annexe 1 de la directive 91/414/CEE (voir http://ec.europa.eu/food/plant/protection/index_en.htm). Au niveau scientifique, de grandes avancées ont été faites dans la connaissance de la biologie de ces micro-organismes antagonistes et de leurs modes d'action pour lutter contre les agents pathogènes. Mais de nombreuses difficultés subsistent, en particulier la régularité de leur efficacité en condition de culture commerciale.

1. *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise

1.1. Position taxonomique

Botrytis a été reconnu comme un genre par Micheli en 1729 où il a été répertorié dans son livre «*Nova Plantarum Genera*». Au début il a été parfois confondu avec *Sclerotinia* spp.

mais des précisions ont été apportées par Smith en 1900 et la confusion a été dissipée par Whetzel en 1945. Le genre, redéfini en 1973 par Hennebert, comprend 22 espèces dont la plupart ont un spectre d'hôtes restreint comme par exemple *B. tulipae* sévissant sur les tulipes, *B. fabae* sur les légumineuses ou *B. squamosa* sur les oignons (Hennebert, 1973). Au contraire, *B. cinerea* est ubiquiste et on dénombre de nombreuses espèces de plantes sur lesquelles il peut engendrer des dégâts sérieux avant et après la récolte. Le nom *Botrytis cinerea* a été donné par Persoon en 1801 à un agent pathogène de la vigne. Ce champignon comme beaucoup d'autres connaît une double classification:

- une forme parfaite (téléomorphe), *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Wetzl. C'est un Ascomycète, de la classe des Discomycètes, de l'ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae.
- une forme imparfaite (anamorphe), *Botrytis cinerea* Pers. C'est un Deutéromycète de la classe des Hyphomycètes, de l'ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae.

C'est de Bary (1866) qui a établi une relation génétique entre *Botrytis cinerea* Pers., organisme asexué, et *Botryotinia fuckeliana* appelé au départ *Peziza fuckeliana*, organisme sexué. Groves et Drayton (1939) observent pour la première fois, *in vitro*, la formation d'apothécies par *B. cinerea* confirmant le lien systématique entre les deux formes du champignon. C'est cependant le nom de *B. cinerea*, largement connu par les mycologistes et phytopathologistes qui fut retenu alors que généralement le nom scientifique d'un champignon est donné par sa forme sexuée.

Dans le vignoble et sur les diverses plantes hôtes, *B. cinerea* a été considéré comme un complexe d'espèces sympatriques. Selon de récentes analyses phylogénétiques, deux principaux groupes génétiques, 'Groupe I' et 'Groupe II' coexistent. Le Groupe I regroupe des isolats présentant une compatibilité végétative entre eux, c'est-à-dire ayant la capacité de former un hétérocaryon viable par la fusion des hyphes (Fournier *et al.*, 2005), et une sensibilité réduite au fongicide anti-*Botrytis* fenhexamid (Albertini *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003). Les isolats du Groupe II ont été divisés en deux types, *transposa* et *vacuma* (Giraud *et al.*, 1997). La présence de deux éléments transposables, Boty (Diolez *et al.*, 1995) et Flipper (Levis *et al.*, 1997), est une caractéristique de *transposa*. De plus, des différences phénotypiques entre les deux types '*vacuma*' et '*transposa*' ont été démontrées: les isolats '*transposa*' (i) ont des petites macroconidies en comparaison des isolats *vacuma* (Giraud *et al.*, 1999), (ii) sont plus souvent résistants à la vinclozoline et au diethofencarbe (Giraud *et al.*, 1999), et (iii) présentent des taux de développement mycélien plus lent lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu riche en nutriments (Martinez *et al.*, 2003).

1.2. Gamme d'hôte

Botrytis cinerea est un champignon polyphage capable d'attaquer plus de 230 espèces de plantes (Jarvis, 1980). Il affecte de nombreuses productions végétales d'importance économique en culture sous serre ou en plein champ, comme par exemple: le raisin, la pomme, la poire, la cerise, la fraise et le kiwi en production fruitière, l'aubergine, la carotte, la laitue, le concombre, le poivron, la tomate, la courgette en production légumière ou des plantes ornementales comme la rose, le gerbera ou le cyclamen. Ce champignon est responsable de lourdes pertes économiques sur de nombreuses cultures (Gullino, 1992). Un exemple de cette large gamme d'hôtes est présenté dans la figure 1.

1.3. Importance économique de la maladie

Botrytis cinerea est l'agent responsable de la pourriture grise. Cet agent pathogène peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte, et dans certains cas de la récolte. Sur le plan économique, ce champignon est par exemple considéré comme un problème phytosanitaire majeur en viticulture dans le monde (Martinez *et al.*, 2005). Il peut s'attaquer à différents stades de développement de la vigne et l'infection par les conidies peut se produire durant toute la saison de croissance: début d'inflorescence, floraison, véraison, stade végétatif et grappe (Kretschmer *et al.*, 2007). On estime les pertes mondiales dues à *B. cinerea* sur vigne à 2 milliards \$ par an (Elmer and Michailides, 2004). De plus, le développement rapide et insidieux de *B. cinerea* engendre chaque année la destruction de récoltes sur des centaines d'hectares de cultures viticoles (Bolay and Pezet, 1987). Les pertes estimées pour la vigne en France correspondent à 15-40% des récoltes selon les conditions climatiques (Cilindre *et al.*, 2007). En Champagne, les taux d'infection peuvent atteindre 15 à 25% selon les années (Cilindre *et al.*, 2007). Par ailleurs, la pourriture grise est à l'origine de conséquences graves sur la qualité des vins. Il peut provoquer une altération de leurs qualités organoleptiques telle que, par exemple, la couleur, le gout, et la moussabilité pour les vins de type champagne (Bocquet *et al.*, 1995; Bocquet *et al.*, 1996; Cilindre *et al.*, 2007).

En cultures sous abris, les risques d'attaque par ce champignon pathogène sont permanents sur par exemple, la tomate, le poivron, la laitue ou la fraise (Jarvis, 1992). Dans une étude effectuée sur 15 serres du sud de la France, Nicot et Baille (1996) ont montré que l'incidence de *B. cinerea* entre mai et juin 1991 variait de 32 à 100%, et que la mortalité des plantes atteignait 46% dans certaines serres. Dans une enquête de plus grande envergure menée dans

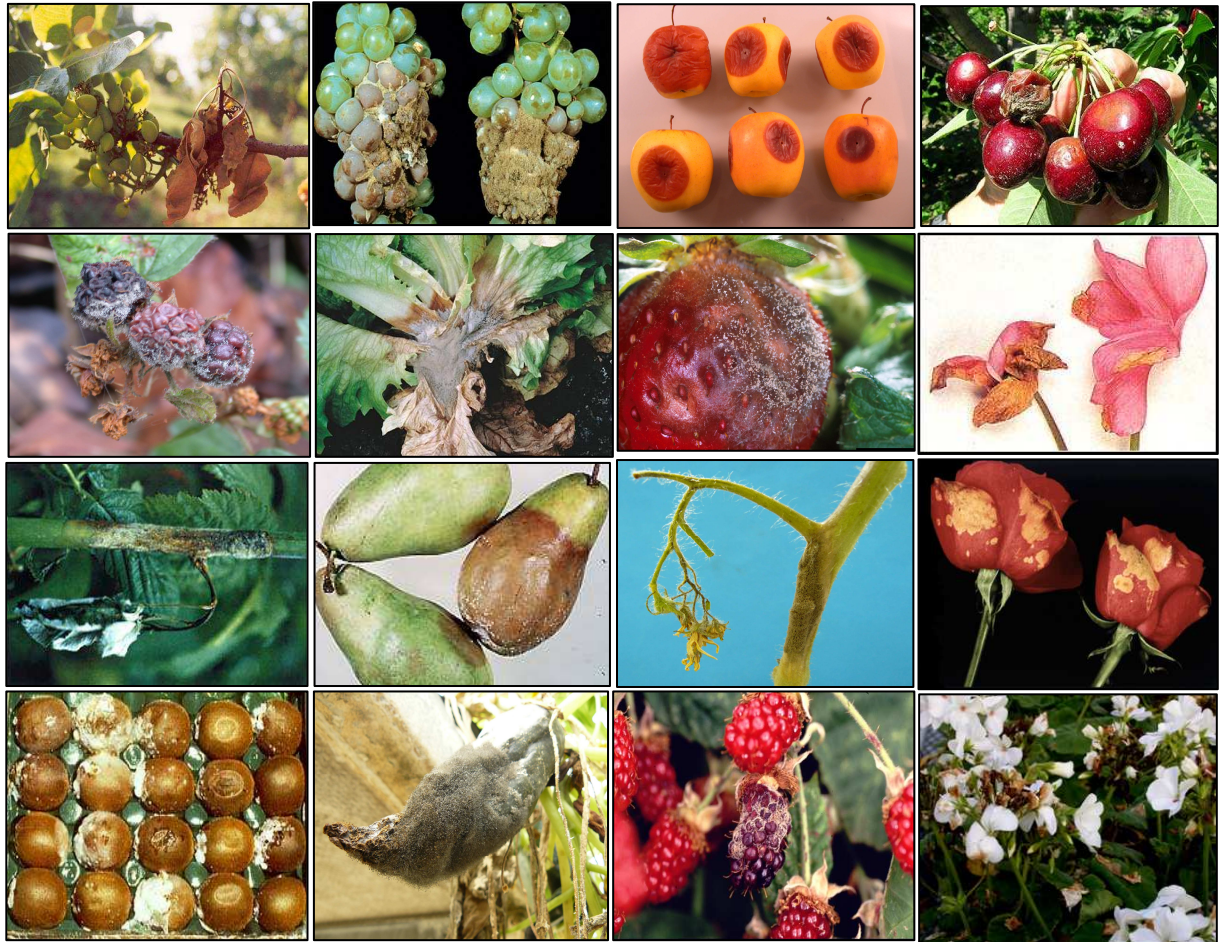


Figure 1. Symptômes causés par l'agent pathogène *Botrytis cinerea* sur différents hôtes.

la même région à la fin avril 1993, Terrentroy (1994) a montré que les attaques de *B. cinerea* ont été trouvées dans 58 des 73 serres de tomates étudiées et une mortalité partielle des plantes par le champignon a été enregistrée dans 31 de ces serres.

Pour combattre la maladie, l'utilisation de fongicides entraîne des coûts financiers importants. Le marché mondial des produits de contrôle de *B. cinerea* est estimé à 15-25 millions de dollars par an (Elad and Stewart, 2004).

1.4. Cycle de développement de la pourriture grise

Au cours de son cycle biologique, *B. cinerea* peut produire du mycélium, des spores asexuées ou conidies, des spores sexuées ainsi que des sclérotés (figure 2).

Le mycélium de *B. cinerea* comprend des filaments articulés, grisâtres ou olivâtres, cylindriques, quelquefois vésiculeux au niveau de la cloison médiane, dont le diamètre varie considérablement suivant les conditions de développement des hyphes. Lorsque le mycélium est au stade de fructification, il produit des touffes de conidiophores grisâtres. Parfois, ce mode de multiplication peut disparaître et laisser place à une prolifération mycélienne blanche qui correspond à l'élongation d'hyphes grêles, hyalins qui se répandent sous forme de "toile" (Viennot-Bourgin, 1965). Le mycélium peut se conserver dans les débris de plantes de la culture précédente (figure 2).

Lorsque les conditions deviennent favorables, *B. cinerea* fructifie pour donner des conidies (figures 2 et 3). Ce champignon produit des conidies sur de très nombreux substrats. Le développement des conidies se manifeste par la production de conidiophores dressés en touffes souvent étendues, constituant un feutrage intense gris (figure 3). Les conidies prennent une part importante dans la dissémination du champignon. Les conidies sont produites dès le printemps dans le cas de culture en plein champ. En revanche, elles peuvent être produites en continue, selon les conditions climatiques, dans le cas de cultures sous abris. Leur libération est favorisée par un climat humide, puis elles sont transportées par le vent, la pluie et les insectes (Holz *et al.*, 2004).

Lorsque les conditions deviennent défavorables au développement de mycélium et de conidies, des sclérotés se forment. Ils sont constitués par du mycélium agrégé blanchâtre. En vieillissant, ils durcissent et deviennent noirâtres (figure 4). Ils sont composés d'un cortex de cellules épaisses formant une mince barrière de cellules pseudo-parenchymateuses et d'une large medulla centrale composée d'hyphes filamenteux (Coley-Smith, 1980). Au printemps, les sclérotés peuvent germer et produire du mycélium ou des conidies. Ils peuvent également être à l'origine de la formation des apothécies (Coley-Smith and Cooke, 1971). Van den Ende

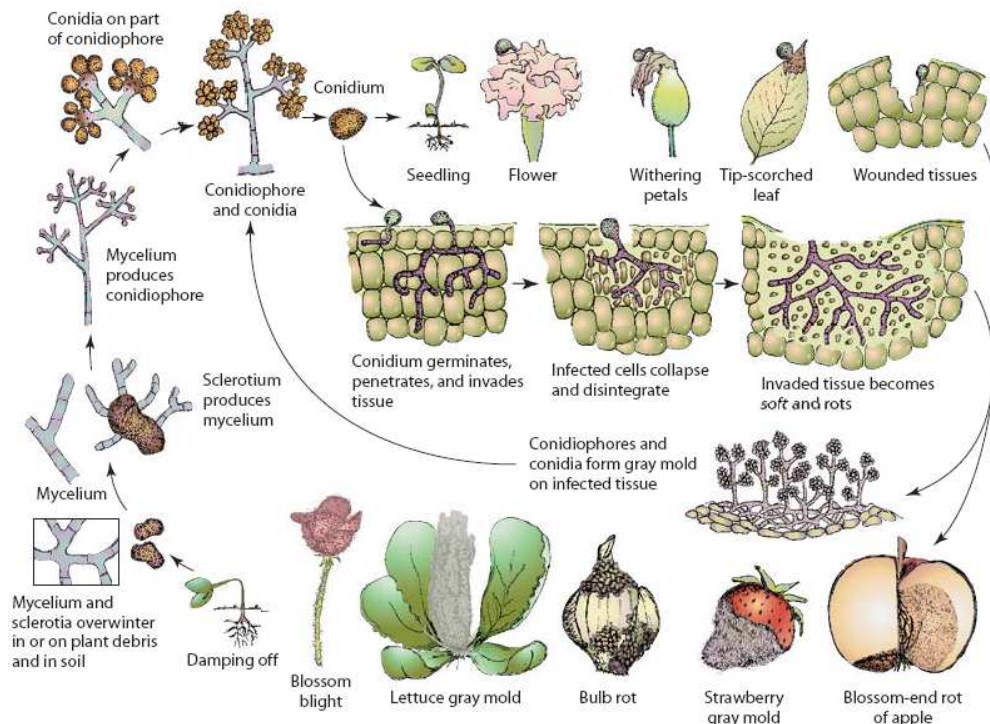


Figure 2. Cycle de développement (production asexuée) de *Botrytis cinerea* sur différentes cultures (d'après Agrios, 2005).

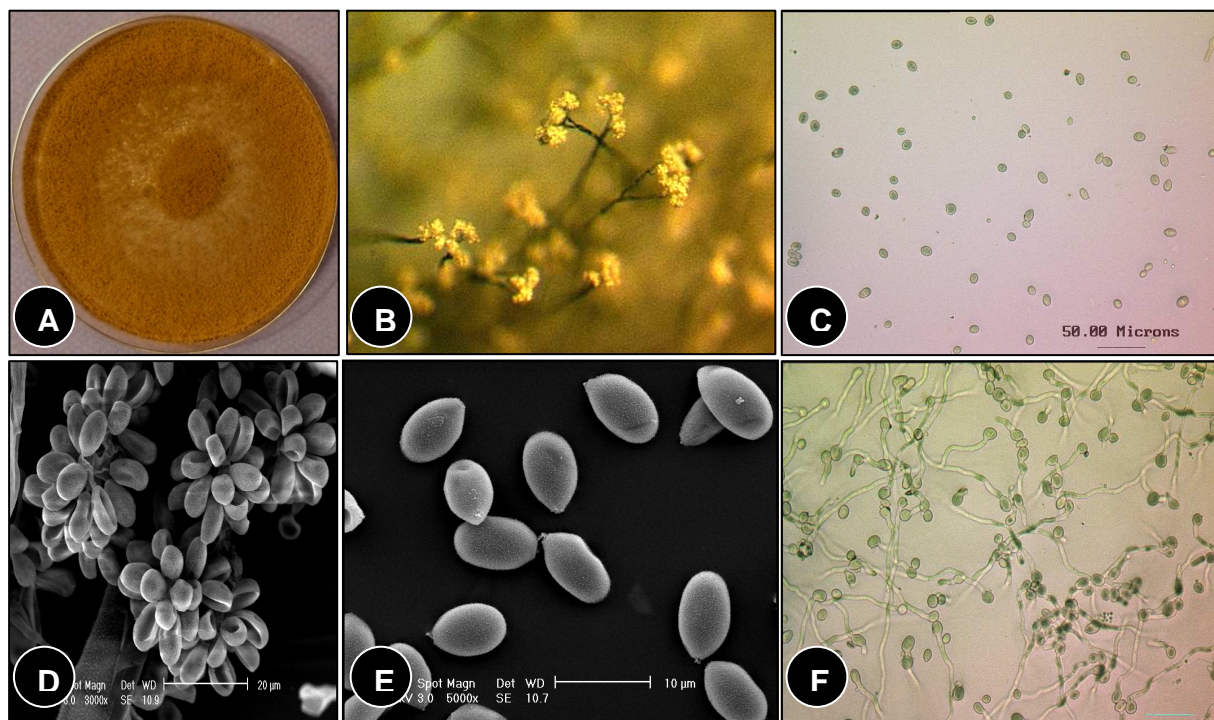


Figure 3. Conidies de *Botrytis cinerea* produites sur boîte de pétri après 14 jours de culture sur un milieu PDA à 21°C en présence de lumière (A). Conidiophores observés en utilisant une loupe binoculaire (B) et un microscope électronique à balayage (D). Conidies observées en microscopie optique (C) et en microscopie électronique à balayage (E). Observation de la germination des conidies sur milieu riche PDA au microscope optique (F).

et Pennock (1996) ont observé que la formation de sclérotés sur les débris végétaux de lys se produit préférentiellement après la récolte entre octobre et décembre. La large gamme de température (5-25° C) à laquelle sont formés les sclérotés suggère que leur formation au champ est rarement limitée par la température (Lorbeer *et al.*, 2004).

Lorsque les conditions sont favorables, les sclérotés peuvent germer pour produire des apothécies (figure 5). Les apothécies sont obtenues par le croisement d'isolats sexuellement compatibles portant des allèles de type sexuel différents, MAT1-1 et MAT1-2 (Faretra *et al.*, 1988). Les descendants issus d'un croisement entre 2 souches sont tous hétérothalliques et transportent l'un ou l'autre allèle du gène de type sexuel (Beever and Weeds, 2004; Delcán and Melgarejo, 2002; Faretra *et al.*, 1988). Les apothécies contiennent des asques linéaires contenant eux-mêmes des ascospores (Beever and Weeds, 2004). Chaque asque contient quatre paires d'ascospores. Les noyaux de chaque paire d'ascospores sont génétiquement identiques car produits par une division mitotique de l'un des quatre produits de la méiose (Faretra and Antonacci, 1987; Lorenz and Eichhorn, 1983). Bien que les apothécies soient rarement observées au champ (Faretra and Antonacci, 1987; Faretra *et al.*, 1988), certaines études montrent que les ascospores peuvent avoir une importance épidémiologique. Par exemple chez *B. cinerea*, les ascospores libérées des apothécies peuvent infecter les feuilles d'oignon au champ et par conséquent, servir de source d'inoculum primaire du champignon (Lorbeer *et al.*, 2004). D'autre part, de récentes études de génétique des populations semblent indiquer que la reproduction sexuée est plus importante que généralement supposée (Beever and Weeds, 2004). Malgré la rareté d'observation des apothécies dans la nature, elles peuvent être obtenues au laboratoire (Faretra *et al.*, 1988). Leur production est déclenchée par des conditions stressantes défavorables à la multiplication végétative comme par exemple une température élevée, une humidité relative réduite ou un appauvrissement nutritionnel du milieu (Urbasch, 1983; Urbasch, 1984; Urbasch, 1985a; Urbasch, 1985b).

1.5. Facteurs influençant le développement du champignon

Pour *B. cinerea*, différents facteurs d'origines extérieures ou dépendants de la plante interviennent dans les premiers stades d'infection, dans le développement de la maladie et dans la sporulation du champignon (Elad and Yunis, 1993; Yunis *et al.*, 1990).

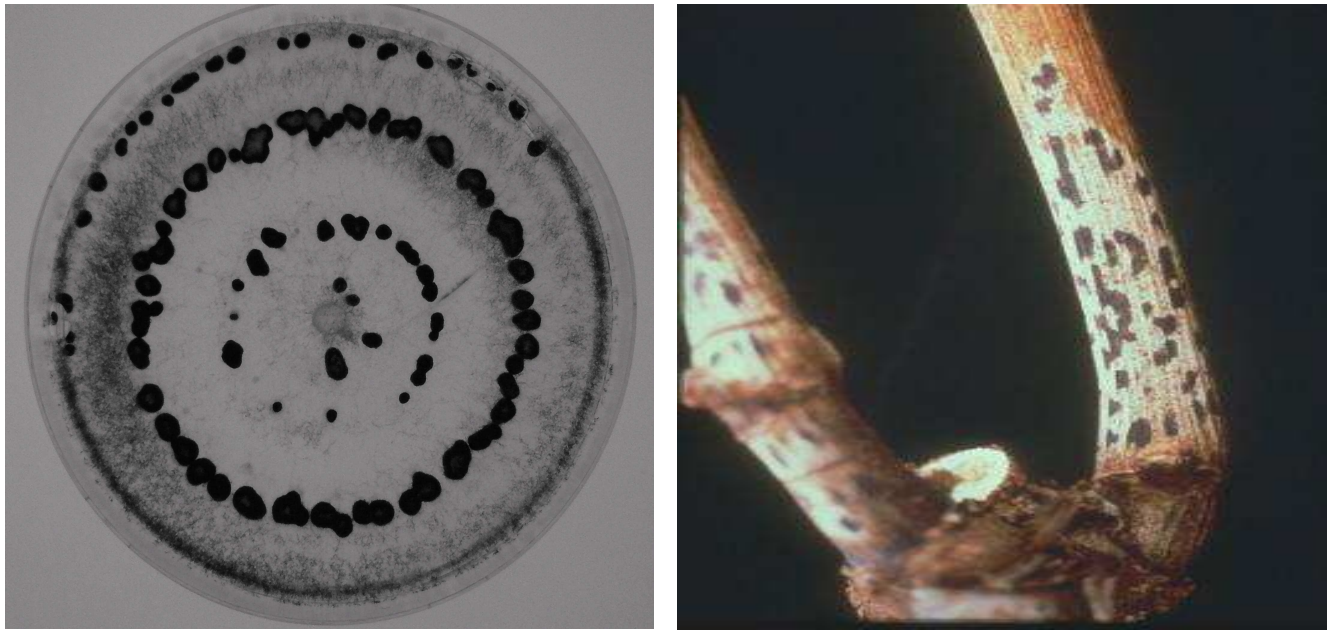


Figure 4. Formation *in vitro* (à gauche) et *in vivo* (à droite) de sclérotes de *Botrytis cinerea* (Source INRA).



Figure 5. Apothécies de *Botryotinia fuckeliana* la téléomorphe de *Botrytis cinerea* isolées sur une pêche en Nouvelle-Zélande (à gauche et au centre). Groupe d'apothécies produit en laboratoire (à droite). (Source Beever and Weeds, 2004)

1.5.1. Exigences nutritives

Du fait du peu de réserves énergétiques endogènes présentes dans les conidies de *B. cinerea*, ce champignon a besoin d'une source exogène de nutriments pour se développer (Kosuge and Hewitt, 1964; Yoder and Whalen, 1975). Les nutriments sont nécessaires à la germination des spores, au développement du mycélium, et à la formation des appressoria (Li *et al.*, 2004). D'après Blakeman (1975), la présence à la fois de carbone et d'azote est nécessaire à la germination des spores du champignon. La germination de conidies de différents isolats de *B. cinerea* est significativement plus faible dans l'eau que dans une solution nutritive (Clark and Lorbeer, 1977). Dans l'eau, le filament germinatif cesse de croître presque immédiatement après l'émergence du tube germinatif de la conidie (Clark and Lorbeer, 1977).

La présence de nutriments tels que le glucose et le fructose favorise la germination et l'élongation du filament germinatif (Clark and Lorbeer, 1977; Kosuge and Hewitt, 1964) et permettent à des conidies âgées de retrouver leur pouvoir germinatif (Shiraishi *et al.*, 1970b). Ainsi une addition de saccharose, maltose, lactose, mannose, galactose ou xylose stimule la germination de conidies de *B. cinerea* âgées de plus de 40 jours (Shiraishi *et al.*, 1970b). La pulvérisation de feuilles d'oignon avec des conidies de *B. cinerea* en suspension dans l'eau n'aboutit pas à des lésions, mais l'ajout d'une source d'éléments nutritifs (sucres et minéraux) entraîne la formation de lésions (Clark and Lorbeer, 1977). Yoder et Whalen (1975) ont montré que la germination des spores et la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* obtenues sur choux nécessitaient une source externe de nutriment. La capacité d'infection des conidies sur tissus de choux dépend aussi d'une source exogène de nutriments (Yoder and Whalen, 1975). Les éléments nutritifs requis pour l'infection peuvent être fournis sous forme de glucose, d'extrait de feuille de choux, de milieu PDA (extrait de pomme de terre-dextrose-agar), ou par une blessure au point d'inoculation. La concentration des éléments nutritifs influence la capacité de *B. cinerea* à provoquer la pourriture des tissus (Yoder and Whalen, 1975). Les mécanismes moléculaires d'induction de la germination par des sources de carbones ont été étudiés en détail (Doehlemann *et al.*, 2006; Doehlemann *et al.*, 2005).

1.5.2. Etat physiologique de la plante, fertilisation

Les quantités d'engrais et la composition de la solution nutritive utilisée influencent la sensibilité de la plante hôte à la pourriture grise. Cependant, les résultats sont parfois contradictoires dans ce domaine (Dik and Wubben, 2004). Un taux d'azote élevé, par exemple, augmente la croissance des plantes et la densité du feuillage mais en même temps sa

sensibilité à *B. cinerea* (Pitchay *et al.*, 2007). Chez les fleurs de chrysanthème, Hobbs et Waters (1964) ont montré une augmentation quadratique (quadratic increase ou X^2) de la pourriture grise en ajoutant de l'azote à différentes concentrations, de 1,5 à 6,0 g/m² (Hobbs and Waters, 1964). En revanche, Verhoeff (1968) a constaté que la sensibilité des tomates augmente avec la baisse du niveau d'azote dans le sol. Hoffland *et al.* (1999) trouve une corrélation linéaire positive entre le rapport C/N des feuilles et la sensibilité des plantes de tomate à *B. cinerea*. Ils attribuent cela à des niveaux variables de sucres solubles et disponibles dans la plante.

1.5.3. Facteurs climatiques

Les conditions environnementales, en particulier l'humidité relative et la température, jouent un rôle clef pour l'infection de la plante par *B. cinerea* et le développement de la maladie. En 1970, Shiraishi *et al.* (1970a) ont détaillé l'effet de la température sur la germination des conidies, la formation d'appressoria et l'élongation de tube germinatif dans de l'eau distillée sur une lame de verre. D'après cette étude, la température optimale pour la germination des conidies était comprise entre 20 et 30°C. À des températures inférieures à 5°C et supérieures à 35°C, les spores de *B. cinerea* ne germent pas après 48 heures d'incubation (Shiraishi *et al.*, 1970a). A 10°C la germination est très retardée avec seulement 60% de conidies germées 48 heures après l'inoculation (Shiraishi *et al.*, 1970a). D'autres études ont également évalué les besoins en température pour que les spores de *B. cinerea* germent. Sirry (1957) ont constaté qu'à 21°C, les conidies de *B. cinerea* germent à 100%. Jarvis (1977) a rapporté que les conidies de *B. cinerea* germent à 100% à 20°C, 15°C et 5°C avec 100% d'humidité. Snow (1949), estime que les conidies de *B. cinerea* ont besoin de niveaux élevés d'humidité relative pour la germination. A 95% d'humidité relative, seulement 80% des conidies de *B. cinerea* germent à 15°C et 5°C, en revanche 100% des spores germent à 20°C (Jarvis, 1977). À 90% d'humidité relative, 85% des conidies germent à 20°C, et la germination s'arrête quand les conditions d'humidité relative et de température sont plus faibles (Jarvis, 1977). D'autre part, la température optimale pour l'élongation du tube germinatif est de l'ordre de 25°C (Shiraishi *et al.*, 1970a). À 15°C, l'élongation des filaments germinatifs et la formation d'appressorium n'est pas visibles, après 48 heures d'incubation. À 20°C, l'élongation des tubes germinatifs est importante et accompagnée de la formation d'appressorium. À 25°C, parfois deux tubes germinatifs peuvent émerger d'une même conidie. À 30°C, l'élongation du tube germinatif est nettement accélérée, mais la formation d'appressorium n'est pas observée. Les

appressoria sont produits en général entre 10 et 30°C, la température optimale étant de l'ordre de 15-20°C (Shiraishi *et al.*, 1970a). Les appressoria sont formés, même à 10°C, malgré le retard de germination des conidies (Shiraishi *et al.*, 1970a). À des températures supérieures à 30°C et inférieures à 10°C, la formation d'appressorium est complètement arrêtée (Shiraishi *et al.*, 1970a).

Dans des conditions d'humidité relative de l'ordre de 80 à 100%, l'incidence de la maladie sur concombre est plus grave qu'en condition sèche (Yunis *et al.*, 1990). Sur fleurs et baies de raisin par exemple, des périodes d'humidité respectivement de 1,3 et 13,9 heures permettent le développement des lésions (Nair and Allen, 1993). Le mycélium aérien et la sporulation se développent d'une manière plus rapide à 21°C, 94% d'humidité relative et en présence d'un vent limité (Thomas and Marois, 1986). Une surface d'eau libre ou une humidité relative élevée (95%) semblent même nécessaires à la germination des conidies et à la pénétration des filaments germinatifs, et au succès de l'infection (Williamson *et al.*, 1995). Davidson et Krysinska-Kaczmarek (2007) ont définis les conditions optimales pour l'infection et la sporulation sur la lentille à 15-25°C . La sporulation est limitée à 10°C et stoppée à une température inférieure à 5°C ou supérieure à 30°C (Davidson and Krysinska-Kaczmarek, 2007). D'après O'Neill *et al.*, (1997), la phase de sporulation est favorisée par une forte humidité relative et l'interruption de ces conditions entraîne un retard de sporulation. Cependant, d'après Hawker (1950), *B. cinerea* semble mieux sporuler en conditions sèches plutôt que dans une atmosphère saturée. Dans l'atmosphère sèche, les conidiophores sont courts et portent de nombreuses spores qui sont facilement dispersées alors que dans une atmosphère saturée, ils sont longs et portent un nombre plus réduit de conidies (Hawker, 1950).

Enfin, les apothécies sont généralement produits dans des conditions fraîches et humides (Kochenko, 1972). Dans des conditions contraires (en atmosphère sèche), les apothécies sèchent rapidement et cessent de former des ascospores (Jarvis, 1977).

1.5.4. Qualité de la lumière

La germination des conidies de *B. cinerea* se produit aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, pourvu qu'il y ait de l'eau et des nutriments en quantité suffisante (Blakeman, 1980). Nicot *et al.*, (1996) ont montré que le taux de germination de spores des *B. cinerea* sur un milieu PDA (Potato dextrose Agar) n'est pas différent quand les spores sont placées sous un film sélectif filtrant les rayons ultraviolets (UV) ou quand elles sont placées sous un film qui n'absorbe pas

les UV. De plus, ces auteurs n'ont constaté aucune différence significative concernant la croissance mycélienne sous les deux films après 72 heures (Nicot *et al.*, 1996). La sporulation de *B. cinerea* est par contre dépendante de la qualité de la lumière reçue et surtout des UV (Elad, 1997; Nicot *et al.*, 1996; West *et al.*, 2000). La production de spores sous un film sélectif filtrant les ultraviolets en boîte de Pétri représente 0,05% de la production de spores sous un film témoin non filtrant et ceci pendant plusieurs semaines après l'inoculation. Ceci démontre que l'absence d'UV inhibe la sporulation plutôt que de la retarder (Nicot *et al.*, 1996). Enfin, il semble que certains isolats soient capables de sporuler à l'obscurité et ne soient pas affectés par la qualité de la lumière (Dik and Wubben, 2004). Nicot *et al.*, (1996) estiment que plus de 15 millions de spores sont produites en 7 jours sur un segment de tige de tomate de 2 cm et que cette sporulation diminue d'une manière radicale pour atteindre seulement 6 à 18 mille spores sous un film sélectif filtrant les UV.

Dans les cultures sous serre, la filtration de la lumière en utilisant un film polyéthylène de couleur verte ou rose permet ainsi d'inhiber la sporulation de *B. cinerea* de 35 à 75% respectivement (Elad, 1997). La propagation des symptômes liés à cet agent pathogène pourrait donc être efficacement limitée par une gestion efficace de la lumière dans les cultures sous abris, du fait de la réduction de la production de spores (Sutton and Peng, 1993).

La survie des conidies dans l'air est également influencée par la qualité de la lumière. D'après Rotem et Aust (1991), les rayons UV influencent fortement la mortalité des conidies; la longévité sous UV a été réduite à 3 minutes (Rotem and Aust, 1991) contre 14 mois pour les conidies sèches incubées à température ambiante (Salinas *et al.*, 1989). Suzuki *et al.*, (1977) ont aussi montré qu'à des températures de 25-27°C, 60 minutes d'irradiation en lumière bleu à 150 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ était suffisante pour inhiber totalement la production de spores par le champignon.

1.6. Diversité phénotypique et génétique de *B. cinerea*

Botrytis cinerea est un champignon présentant une forte diversité phénotypique pour sa morphologie sur milieu de culture, sa capacité à produire des conidies selon la qualité de la lumière, ses exigences nutritives, son agressivité sur plante ou sa sensibilité aux fongicides. Il présente également une forte diversité génétique.

1.6.1. Morphotypes

La diversité morphologique sur milieu artificiel gélosé Malt-Agar de *B. cinerea* a été étudiée par Martinez *et al.*, (2003). Dans cette étude, les colonies de 111 isolats de *B. cinerea* ont été

classées visuellement en huit types morphologiques : quatre mycéliens caractérisés par une quasi-absence de sclérotés et quatre sclérotiens (tableau 1).

1.6.2. Sensibilité à la qualité de la lumière: capacité à produire des conidies

Plusieurs études ont mis en évidence que les ultraviolets proches (300 à 400 nm) stimulent la production de spores alors que les infra rouges (> 720 nm) inhibent la sporulation chez *B. cinerea* (Epton and Richmond, 1980; Jarvis, 1992). Cependant, l'ensemble des isolats naturels de *B. cinerea* ne présentent pas la même sensibilité aux UV. L'inhibition varie d'un isolat à l'autre du champignon, ainsi que selon la qualité de la lumière qui atteint la culture (Dik and Wubben, 2004; Elad, 1997). Il existe des isolats capables de sporuler en absence de rayonnements ultraviolets (Nicot *et al.*, 1996). Certains isolats sont même capables de sporuler à l'obscurité (Dik and Wubben, 2004; Steward and Long, 1987; Thomas and Marois, 1986). Ces isolats ne semblent pas minoritaires dans les populations naturelles de *B. cinerea*. Steward et Long (1987) ont en effet montré que 31 isolats sur 43 testés étaient capables de sporuler à l'obscurité.

1.6.3. Agressivité sur plante

L'ensemble des isolats naturels de *B. cinerea* ne présentent pas le même niveau d'agressivité sur une même plante hôte. Par exemple, Tiedemann (1997), rapporte une différence d'agressivité d'isolats sur le haricot vert, *Phaseolus vulgaris*. Decognet *et al.*, (2009) ont également remarqué une variation d'agressivité de 17 souches de *B. cinerea* sur la tomate (Decognet *et al.*, 2009a). Sur vigne, 9 isolats sur 44 testés ne sont pas capables d'attaquer des feuilles de vigne en conditions contrôlées de laboratoire (Mirzaei *et al.*, 2009)

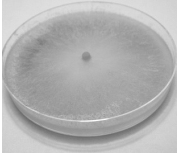
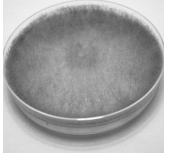
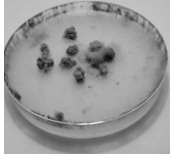

1.6.4. Exigences nutritives

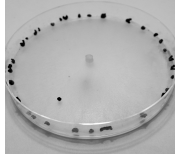
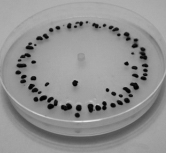
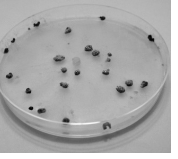
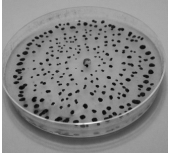
Afin de pouvoir germer, croître et sporuler, les spores de *B. cinerea* ont des besoins nutritifs. De nombreuses expériences ont montré que la germination de *B. cinerea* dans l'eau était significativement plus faible que dans une solution nutritive (Kosuge and Hewitt, 1964). La germination des spores de *B. cinerea* dans l'eau (absence de nutriments) a cependant été observée pour certaines souches (Doehlemann *et al.*, 2006)

1.6.5. Sensibilité aux fongicides

Diverses études ont mis en évidence des niveaux différents de résistance aux fongicides dans les populations naturelles de *B. cinerea* (Moorman and Lease, 1992; Raposo *et al.*, 1995;

Tableau 1. Classification morphologique de *Botrytis cinerea* sur milieu Malt-Agar (d'après Martinez et al. 2003)

Type Mycélien "M"				
Representation				
Phenotype	M 1	M2	M3	M4
Mycélium	rasant	aérien	masses mycéliennes	épais et dense
Sporulation ⁽¹⁾	0	1 ou 2	1 ou 2	1
Sclérotés ⁽²⁾	0	0	0	0

Type Sclérotien "S"				
Representation				
Phenotype	S1	S2	S3	S4
Mycélium	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant
Sporulation ⁽¹⁾	1	1	1	0
Sclérotés ⁽²⁾	En bordure des boîtes de Pétri	Plutôt de grande taille formant un ou des cercles	Plutôt de grandes tailles, éparpillés	Nombreux, petits et éparpillés

¹ Sporulation : 0: absence; 1:sporulation peu abondante; 2: sporulation très abondante

² Sclérotés : 0: absence; 1: rares; 2: très abondantes

Raposo *et al.*, 2000; Yourman *et al.*, 2003). Par exemple, Corbaz (1993) a montré que sur 38 souches de *B. cinerea* isolées de cultures maraîchères en Suisse (tomate et laitue principalement), 44,7% sont résistantes aux dicarboximides, 73,6% aux benzimidazoles et 31,8% présentaient une double résistance. Moyano *et al.*, (2004) ont noté que sur 307 isolats collectés de différents hôtes dans différentes serres du Sud-Est de l'Espagne, 90% étaient résistants aux benzimidazoles, 77% aux dicarboximides, 23% aux N-phenylcarbammates et 12% aux anilinopyrimidines (Moyano *et al.*, 2004). Des isolats naturels de *B. cinerea* résistants au fenhexamide ont été détectés avec une fréquence de 10% (sur 200 isolats testés) alors que la population de l'agent pathogène n'avait, à priori, jamais été exposée à ce fongicide (Zhang *et al.*, 2007). Myresiotis *et al.*, (2007) ont récolté 55 isolats de *B. cinerea* au cours d'une saison de culture en 2005 sur des légumes cultivés dans 18 serres en Crète. Les résultats de cette étude ont révélé l'existence de souches résistantes aux benzimidazoles (61,8%), au cyprodinil (57,4%), au pyriméthanile (49,1%), aux dicarboximides (18%). Cependant, aucun isolat n'est résistant aux phenylpyrroles, et un seul isolat est résistant au fenhexamide, botryticide utilisé au milieu des années 1990 (Myresiotis *et al.*, 2007). Ils ont aussi détecté pour la première fois, le développement de souches résistantes aux anilinopyrimidines (Myresiotis *et al.*, 2007). Sur 712 isolats de *B. cinerea* collectés sur tomates et autres cultures, 27% sont résistants aux benzimidazoles, 37% aux dicarboximides, 3% au pyriméthanile et une résistance de l'ordre de 0,2% au fludioxonil et au fenhexamide a été observée (Korolev *et al.*, 2009).

1.6.6. Diversité génétique

Le développement de techniques moléculaires a révolutionné la génétique des populations fongiques en fournissant de nombreux marqueurs génétiques (Bridge *et al.*, 1998). Différents types de marqueurs moléculaires ont été développés chez *B. cinerea* tels que les RAPDs, les RFLPs, les AFLPs et les marqueurs microsatellites (Brygoo *et al.*, 1998; Fournier *et al.*, 2002; Giraud *et al.*, 1997; McDonald, 1997). Thompson et Latorre (1999) ont étudié des isolats de différentes plantes hôtes au Chili: ils ont constaté une forte diversité génétique. Alfonso *et al.*, (2000) ont étudié 40 isolats en Espagne et ont trouvé que l'ensemble de la population est très hétérogène, avec peu de différences à l'intérieur de sous-populations issues d'une même serre ou d'une même région. Yourman *et al.*, (2000) ont trouvé que les 56 isolats collectés dans des serres en Caroline du Sud (USA) sont différents, mais ils ont constaté certains regroupements par rapport à la sensibilité aux fongicides. Des haplotypes différents ont été identifiés sur 69 isolats en provenance du Chili, dont deux d'un même fruit de kiwi (Muñoz *et al.*, 2002). Les

données issues de cette étude montrent un regroupement des isolats par leur hôte d'origine (Muñoz *et al.*, 2002). En utilisant 16 marqueurs moléculaires RFLP, Giraud *et al.*, (1997) ont pu identifier 134 haplotypes différents dans un échantillon de 259 isolats provenant de raisins en Champagne (France). Les isolats provenant de la même plante ont toujours des haplotypes différents et jusqu'à cinq haplotypes différents ont été trouvés dans des spores isolées à partir d'une seule plante (Giraud *et al.*, 1997). Karchani-Balma *et al.*, (2008) ont génotypé 153 isolats de *B. cinerea* provenant de différentes cultures en Tunisie à l'aide de 9 microsatellites. Le champignon présente une grande diversité génotypique et cette diversité est modelée par le lieu d'échantillonnage (serre *versus* plein champ), la plante hôte et l'origine géographique des isolats (Karchani-Balma *et al.*, 2008). L'échantillonnage de 184 isolats dans six régions de France sur vigne et ronces, a permis de mettre en évidence 180 génotypes différents à l'aide de marqueurs microsatellites (Fournier and Giraud, 2008). Enfin, une grande diversité génétique a été observée dans des populations aériennes d'isolats de *B. cinerea* collectés dans des serres expérimentales de tomate (Decognet *et al.*, 2009a).

2. Stratégies de protection des plantes contre *B. cinerea*

À l'heure actuelle, il n'existe aucune variété commerciale résistante à la pourriture grise pour l'ensemble des cultures attaquées par le champignon (Dik and Wubben, 2004). Cependant, il existe d'importantes différences dans la sensibilité à la pourriture grise pour certaines plantes. Chez la fraise par exemple, de grandes différences d'incidence de la maladie ont été révélées entre des cultivars différents (Legard *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2001). Chez le concombre, certains cultivars résistants à l'oïdium sont plus sensibles à *B. cinerea* (Dik and Wubben, 2004). Sur Pelargonium, rosier et Gerbera, certains génotypes sont moins sensibles que d'autres à *B. cinerea* (Dik and Wubben, 2004; Uchneat *et al.*, 1999). Certaines différences dans la sensibilité sont attribuées aux différences d'architecture de la plante et à la densité de feuillage (Dik and Wubben, 2004). Toutefois, certaines résistances décrites sont d'origine génétique. Sur tomate, la résistance à *B. cinerea* est quantitative et liée à différents gènes de résistance chez l'hôte (Dik and Wubben, 2004; Finkers *et al.*, 2008). Une résistance partielle liée à trois QTL a été identifiée chez une variété sauvage de la tomate *Solanum habrochaites* LYC4 (Finkers *et al.*, 2008).

Des essais de transgénèse ont commencé à donner des résultats intéressants. Par exemple, Powell *et al.*, (2000) ont réussi à réduire le développement de *B. cinerea* sur les fruits mûrs de tomates transgéniques. La dégradation des tissus a été diminuée de près de

15%, comparativement aux fruits non transgéniques. Dans les feuilles transgéniques, les lésions des tissus ont été réduites d'environ 25% (Powell *et al.*, 2000).

Dans l'avenir, les connaissances acquises dans ce domaine pourraient apporter des éléments pour la gestion de ce champignon au champ. Cependant, à l'heure actuelle la lutte contre *B. cinerea* repose principalement sur l'utilisation de produits phytosanitaires. Différentes stratégies de lutte culturale ont aussi été développées et de nombreux travaux sont effectués pour mettre en place et développer des stratégies de lutte biologique efficace. Actuellement, aucune des méthodes disponibles ne permet de garantir une efficacité totale contre *B. cinerea* dans les cultures.

2.1. Lutte chimique

La lutte chimique se définit par l'utilisation de fongicides pour détruire, affaiblir ou réprimer le champignon. A partir des années 1950, il y a eu une expansion rapide de l'emploi de produits phytopharmaceutiques, liée à l'essor de la chimie de synthèse. Les fongicides anti-*Botrytis* utilisés en végétation ont largement évolué depuis le début des années 1970, où les premières matières actives apparues sur le marché français pour lutter contre la pourriture grise furent le folpel, le captafol, l'euparène (dichlofluanide) et le thirame. Des progrès ont été réalisés dans les années 1970 avec la commercialisation des benzimidazoles, des thiophanates, et des dicarboximides à partir de 1976 (Leroux *et al.*, 1999). Actuellement, les fongicides restent des outils indispensables pour lutter contre *B. cinerea* en pré- et post-récolte et assurer une production suffisante (Leroux, 2004). Une liste de produits phytopharmaceutiques homologués en France contre *B. cinerea* est citée dans le tableau 2 (ACTA, 2008). La plupart des fongicides affectent directement des fonctions essentielles, comme par exemple la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire (Leroux, 2004). L'utilisation de produits phytopharmaceutiques peut entraîner le développement de souches résistantes à ces fongicides (Latorre *et al.*, 2002; Leroux, 2004; Sergeeva *et al.*, 2002). Bollen et Scholten (1971) sont, par exemple, les premiers à isoler une souche de *B. cinerea* résistante au bénomyl sur du cyclamen traité pendant 2 semaines avec du benlate. Dans les cultures sous serre, la résistance au bénomyl dans les populations de *B. cinerea* se stabilise à un pourcentage très élevé et persiste pendant de nombreuses années après l'arrêt des traitements (résistance permanente), probablement du fait d'une compétitivité identique à celle des souches sensibles

Tableau 2. Principaux produits phytopharmaceutiques homologués en France contre *B. cinerea* (ACTA 2008 ; <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>)

Famille de fongicides	Matière(s) active(s)	Effet	Cible	Exemple de plantes traitées	Exemples de spécialités commerciales
Sulfamides	Dichlofluanide	Contact	multi-sites	Vigne, Fraise	Euparène
Phénylpyrroles	Fludioxonil	Contact	Polyols et osmorégulation: histidine, protéine kinase	Vigne	Sekoya, Shirilan
Anilino-pyrimidines	Pyrimethanil, Cyprodinil	Contact + Vapeur + Activité translaminaire	Biosynthèse des acides aminés ou des protéines	Vigne, Tomate	Scala, Sari TF, Toucan
Hydroxyanilides	Fenhexamid	Contact	Biosynthèse de stérole, inhibition de la 3-ceta-réductase (C4-déméthylaon)	Tomate, Fraise	Lazulie, Teldor
Dicarboximides	Iprodione	Contact	Polyols et osmorégulation: histidine, protéine kinase	Vigne e, Tomate	Rovral, Rovral Aqua flo, Chipco Green
Carboxamides	Boscalide	Contact et Systématique	Inhibition la succinate ubiquinone réductase, arrêt de la respiration et la production d'énergie	Vigne, Haricot	Cantus, Pictor pro
Strobilurines	Azoxystrobine	Contact et Systématique	Blocage de la respiration + arrêt de la production d'énergie	Fraise	Amistar, Ortiva, Heritage
Chlorothalonil	Chloronitriles	Contact	Réactions enzymatiques chez les spores	Vigne	Dorimat, Fungistop DF, Fungistop FL
Cyproconazole + Chlorothalonil	Triazoles+ Chloronitriles	Contact	Réactions enzymatiques chez les spores	Vigne	Citadelle, Marathon, Milfal

(Faretra *et al.*, 1989; Katan *et al.*, 1989). De même, les applications fréquentes sur vigne de benzimidazoles et de thiophanates (bénomyl, carbendazime, thiophanate-méthyl par exemple) ont provoqué très vite l'apparition de souches résistantes à ces molécules (Georgopoulos, 1977). Des souches résistantes aux fongicides de la famille des dicarboximides, tels que l'iprodione, le vinchlozoline et la procymidone, sont apparues pour la première fois en 1977 (Pappas *et al.*, 1979). Ces résistances sont encore détectées aujourd'hui (Myresiotis *et al.*, 2007). Une double résistance aux dicarboximides et aux benzimidazoles a été signalée en 1979 pour la première fois (Pappas *et al.*, 1979). En 1987, l'association du diéthofencarbe et du carbendazime (Sumico L) démontre son efficacité sur les souches résistantes à plusieurs familles de fongicides (Elad *et al.*, 1992a). Cependant, de nouvelles résistances sont apparues là-aussi, quoique de type non-persistant (Leroux and Moncomble, 1993). Actuellement, on observe des résistances à la majorité des familles de fongicides utilisées contre *B. cinerea* (Couderchet, 2003; Leroux, 2004). Ces phénomènes de résistance constituent un problème dans la lutte contre *B. cinerea*, justifiant ainsi l'intérêt actuel pour l'étude de méthodes alternatives à la lutte chimique contre ce champignon.

2.2. Méthodes prophylactiques

Selon Bernard et Bugaret (2002) la prophylaxie en matière de protection des végétaux représente l'ensemble des mesures pouvant être conseillées afin de prévenir ou défavoriser l'installation d'un organisme nuisible et son développement dommageable sur un territoire déterminé. La prophylaxie repose sur des moyens directs visant à éloigner ou à combattre l'organisme indésirable en situation de nuire ou sur des mesures indirectes ayant pour objectif de minimiser ou de rendre impossible l'expression de la nuisibilité de l'organisme considéré. Ces mesures prophylactiques occupent une place importante dans la lutte contre les maladies fongiques des plantes. Elles passent par une meilleure gestion de l'humidité et de la température. L'utilisation de systèmes de protection et de prévention (pratique de la rotation des cultures, graines saines, etc.) reste aussi indispensable. Pour lutter contre *B. cinerea*, certaines mesures sont préconisées :

- Retirer de la parcelle ou de la serre les feuilles sénescentes et les organes infectés afin de réduire les sources d'inoculum (Richard and Boivin, 1994). *Botrytis cinerea* est capable de coloniser rapidement les tissus nécrotiques (Köhl *et al.*, 1999) et de produire des quantités importantes d'inoculum secondaire par la suite. Dik et Wubben (2004), ont étudié l'effet du retrait des feuilles sénescentes sur l'épidémiologie de *B. cinerea* attaquant les plantes de concombre sous serre aux Pays-Bas. Ils ont trouvé qu'après 2 mois de culture, le

nombre des lésions sur tige par plante et le nombre de plantes mortes ont été réduits d'environ 50% en comparaison avec le témoin (Dik and Wubben, 2004).

- Dans les serres, effeuiller afin de permettre une circulation d'air optimale et réduire ainsi l'hygrométrie (Decognet *et al.*, 2009b). L'effeuillage est réalisé par une coupe franche au ras de la tige en évitant les jours pluvieux (Mouren, 1999). L'effeuillage au ras de la tige sans laisser de chicot de pétioles diminue significativement les risques d'infection des plaies (Decognet *et al.*, 1997; Decognet *et al.*, 2009b).

- Réduire la densité de plantes afin de limiter les zones de confinement entraînant l'accroissement de l'humidité relative et de la condensation dans les serres (Daugaard *et al.*, 2003; Jarvis, 1992). Dik et Wubben (2004) ont remarqué que le taux de fleurs de cyclamen infectées par *B. cinerea* augmente avec la densité des plantes.

- Raisonner la fertilisation afin de limiter le développement de *B. cinerea*. L'apport de certains composés dans le sol peut limiter le développement de la maladie sur la plante. L'efficacité de cette méthode est confirmée par plusieurs études et sur plusieurs cultures (Daugaard *et al.*, 2003; Elad and Volpin, 1993; Vancon, 1992; Volpin and Elad, 1991). Par exemple, des plantes de concombre ont été cultivées dans des tunnels de polyéthylène en conditions commerciales, fertilisées avec du N-P-K 7:3:7%. Au cours de deux saisons hivernales pendant lesquelles la teneur en nitrate est demeurée faible dans le fertilisant, une addition de potassium à ce fertilisant a réduit significativement (27-33%) l'incidence de la pourriture grise des fruits causée par *B. cinerea* alors que l'addition de calcium l'a réduite de 35 à 50% (Elad *et al.*, 1992b). Au cours de la seconde saison, l'infection de la tige par *B. cinerea* a été réduite de 50 et 60%, respectivement, par des traitements avec le potassium et le calcium (Elad *et al.*, 1992b).

2.3. Protection biologique

Le terme "lutte biologique" recouvre différents concepts selon les disciplines impliquées dans la protection des cultures (Nordlund, 1996). La définition officielle par l'OILB (Organisation Internationale de la Lutte Biologique) stipule que la protection biologique est « *l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs* ». Le principe de la lutte biologique est basée sur l'exploitation par l'homme et à son profit d'une relation naturelle entre deux êtres vivants :

- la **cible** (de la protection) est un organisme indésirable, pathogène ou ravageur d'une plante cultivée, mauvaise herbe, etc.

- l'**agent** de protection (ou auxiliaire dans le cas des ravageurs) est un organisme différent, le plus souvent un parasite (ou parasitoïde), un prédateur ou un agent pathogène du premier, qui le tue à plus ou moins brève échéance, éventuellement en s'en nourrissant, ou tout au moins qui limite son développement.

D'après la définition de Cook et Baker (1984), la lutte biologique consiste à réduire la densité d'un agent pathogène et/ou l'activité de celui-ci (= le potentiel infectieux) en mettant en œuvre un ou plusieurs organismes autres que l'homme.

Nous adopterons cette définition pour que la protection biologique accepte les composés minéraux et organiques, les extraits des plantes, etc. de manière à élargir la gamme des produits à l'ensemble des produits autorisés dans les productions biologiques.

D'après Brunel et Fournet (2002), après avoir identifié un potentiel de protection contre un agent pathogène en conditions de laboratoire, le développement d'une méthode de protection biologique nécessite, en pratique, quatre étapes : (i) étudier la biologie de l'agent pathogène, (ii) étudier la biologie de l'agent de protection biologique s'il s'agit d'un organisme vivant, (iii) mettre au point une production de l'agent de protection biologique répondant au besoin des expérimentations tant au laboratoire qu'en conditions naturelles, et (iv) valider les expérimentations en laboratoire par des tests en plein champ.

2.3.1. De nombreux agents de lutte biologique décrits

Dans les paragraphes suivants, quelques exemples d'agents de lutte biologique ayant montré une activité antagoniste vis-à-vis de *B. cinerea* seront présentés.

2.3.1.1. Composés minéraux et organiques

Les composés minéraux et organiques peuvent être utilisés comme fongicides d'origine naturelle pour le contrôle des agents pathogènes des plantes (Tripathi and Dubey, 2004). Par exemple, le chitosan qui est une forme soluble de la chitine et ses dérivés ont des propriétés de protection des plantes contre certains champignons phytopathogènes (Bautista-Banos *et al.*, 2006). Sur des plantes traitées, ce produit déclenche une cascade de réactions de défense contre les attaques d'agents pathogènes. Le chitosan a surtout été utilisé comme agent de lutte contre *B. cinerea* en protection post-récolte. Ce produit induit une résistance dans le fruit et n'inhibe pas directement l'agent pathogène (El-Ghaouth *et al.*, 1997). Il peut être utilisé en

solution, sous forme de poudre mouillable sur les fruits en stockage ou en tant qu'enrobage de graines et de fruits (Choi *et al.*, 2002).

Nigro *et al.*, (2006) ont testé l'activité *in vitro* et *in vivo* de 19 sels pour contrôler *B. cinerea* sur des raisins de table après récolte. Plusieurs sels peuvent réduire la croissance mycélienne de *B. cinerea in vitro* sur un milieu glucose-agar. Parmi ces sels le chlorure de calcium (CaCl₂), la carbonate de potassium (K₂CO₃), le bicarbonate de sodium (NaHCO₃) et le carbonate de sodium (Na₂CO₃) réduisent significativement l'incidence de la pourriture grise *in vivo* (Nigro *et al.*, 2006). La carbonate de potassium, le bicarbonate de sodium et le carbonate de sodium ont montré un effet similaire *in vitro* (inhibition de la germination des conidies et la croissance du mycélium de *B. cinerea*) et *in vivo* (réduction de l'incidence de la pourriture grise sur les baies de raisins), tandis que le chlorure de calcium n'est efficace qu'*in vivo* (Nigro *et al.*, 2006). De Capdeville *et al.*, (2005) ont aussi montré que la pulvérisation de 10 à 20 mM de sulfate de calcium sur rosiers, 24 heures avant la récolte, réduit l'incidence de *B. cinerea* sur les fleurs de rose en stockage.

2.3.1.2.Extraits de plantes

Le contrôle des bioagresseurs par des extraits végétaux a longtemps été réalisé de manière traditionnelle et donc leur utilisation repose souvent sur des bases empiriques. La meilleure connaissance des mécanismes d'action mis en œuvre par ces produits offre des perspectives nouvelles pour la protection des cultures, en raison de leurs nombreux avantages écologiques. Plusieurs approches se distinguent actuellement : l'utilisation de formulations phytosanitaires spécifiques (biopesticides d'origine végétale), ou mixtes (association avec des pesticides organiques de synthèses). Ces deux démarches ouvrent des possibilités de développement commercial à ces substances d'origine végétale pour lutter contre les maladies des plantes.

En ce qui concerne *B. cinerea*, un extrait de feuilles de la Renouée de Sakhaline (*Reynoutria sachalinensis*, nom commercial Milsana) a été décrit comme un éliciteur de défense de la vigne contre *B. cinerea* (Carlen *et al.*, 2003). Dans les vignobles allemands, un traitement des baies de raisin avec le Milsana tous les 7-10 jours entraîne un meilleur contrôle de la pourriture grise que le soufre et le cuivre (Schmitt *et al.*, 2002). Aux Etats-Unis, quatre traitements de Milsana, réalisés entre la véraison et la récolte, a réduit l'incidence de *B. cinerea* dans les grappes de raisin de 50% (Schilder *et al.*, 2002). Ce produit est d'ailleurs homologué aux Etats-Unis sur cultures ornementales, en tant que biofongicide (voir <http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients>).

Le mélange d'extraits d'algues et de chlorure d'aluminium (AlCl_3), contenus dans le produit Synermix, induit l'accumulation de resvératrol, composé phénolique antimicrobien, dans les feuilles de vigne (Jeandet *et al.*, 2000; Jeandet *et al.*, 1996). Ceci induit par conséquent une résistance systématique chez la plante. La quantité de resvératrol accumulée est plus importante chez la variété *Rupestris* du Lot, ce qui indique que la quantité de resvératrol produite par la plante est dépendante de la variété. Dans des vignobles traités pendant 8 ans, Synermix a renforcé l'efficacité de l'iprodione contre *B. cinerea* (Jeandet *et al.*, 2000; Jeandet *et al.*, 1996).

La propolis est une résine végétale utilisée par les abeilles comme anti-infectieux pour assainir la ruche. De consistance visqueuse, elle est recueillie par les abeilles sur certaines parties des végétaux. Elle est produite sur certains conifères et sur les bourgeons de plusieurs espèces d'arbre. La propolis contient des protéines, des acides aminés, des vitamines, des minéraux et des flavonoïdes (Marcucci, 1995; Walker and Crane, 1987). Elle a une activité antibiotique, antibactérienne et antifongique (Tosi *et al.*, 1996). La propolis a été utilisée par Lima *et al.*, (1998) pour inhiber *B. cinerea* en traitement après récolte. La concentration de 4% de la propolis dans l'eau distillée inhibe la croissance mycélienne de *B. cinerea* de plus de 50% en boîte de Pétri (Ozcan, 1999).

Enfin la mise en évidence de molécules de défense des plantes pourrait trouver un intérêt dans le développement de biopesticides d'origine végétale. Cependant un point limitant dans l'utilisation de ces molécules est lié à la difficulté de leurs productions en grandes quantités. Le resvératrol est par exemple un composé polyphénolique de la classe des stilbènes (composé aromatique) présent dans certains fruits comme les raisins, les mûres ou les cacahuètes (Baarlen *et al.*, 2004; Creasy and Creasy, 1998). Il joue un rôle protecteur de la plante contre les attaques de parasites (Hart, 1981). Le resvératrol ne présente pas une toxicité immédiate vis-à-vis de *B. cinerea* à cause de son caractère hydrophile et l'incapacité à atteindre sa cible dans les cellules fongiques (Pezet and Pont, 1995). Cependant une longue incubation de *B. cinerea* avec le resvératrol inhibe la germination des conidies, ainsi que la croissance du mycélium (Adrian *et al.*, 1997). Dans cette étude, Adrian *et al.*, (1997) ont montré que 90 $\mu\text{g/ml}$ de resvératrol réduit la germination des conidies de *B. cinerea* de 50%. De plus, le resvératrol réduit la croissance mycélienne de *B. cinerea* à des concentrations de 60 à 140 $\mu\text{g/ml}$. L'exposition de *B. cinerea* à de telles concentrations de resvératrol a entraîné des changements cytologiques chez le champignon, tels que la production de tubes germinatifs secondaires, la formation de tubes germinatifs cambrés, la granulation du

cytoplasme et la rétraction de protoplasme dans les cellules de mycélium (Adrian *et al.*, 1997).

2.3.1.3. Agents microbiens

La protection biologique contre *B. cinerea* à l'aide de microorganismes antagonistes, champignons filamenteux, levures et bactéries, a été intensivement étudiée au cours des dernières décennies (pour revue, voir Droby *et al.*, 2009; Elmer and Reglinski, 2006; Janisiewicz, 1998; Mari *et al.*, 2003; Paulitz and Belanger, 2001; Van Lenteren, 2000).

Les premiers exemples de lutte biologique contre *B. cinerea* avec des microorganismes remontent aux travaux de Newhook (1951) et Wood (1951). Ces auteurs ont inoculé des feuilles sénescents de laitue avec les champignons *Fusarium* spp. et *Penicillium claviforme*: ces deux champignons antagonistes empêchent l'installation de *B. cinerea*. (Newhook, 1951; Wood, 1951). Wood (1951) estime que les activités saprophytes de ces deux antagonistes (*Fusarium* spp. et *Penicillium claviforme*) sur les tissus morts de laitue sont responsables du contrôle de l'agent pathogène *B. cinerea* en conditions naturelles. Un peu plus tard, Newhook (1957) a pu contrôler *B. cinerea* sur tomates sous serres par pulvérisation d'une suspension de spores de *Cladosporium herbarum* et *Penicillium* sp. Inoculé sur les débris de fleurs attachés au fruit, *C. herbarum* contrôle efficacement *B. cinerea* sur la fraise, en protégeant les fleurs dans les conditions de plein champ (Bhatt and Vaughan, 1962). Blakeman et Fraser (1971) et Blakeman (1972) ont signalé l'effet antagoniste de bactéries vis-à-vis de *B. cinerea* sur les feuilles de chrysanthèmes et de betteraves. En conséquence, les antibiotiques produits par ces bactéries ont été étudiés pour leur effet inhibiteur sur la germination des spores de *B. cinerea* sur feuilles de betterave (Blakeman and Szejnberg, 1974). Depuis les années 1970, différentes espèces de *Trichoderma* spp. ont été étudiées pour le contrôle de *B. cinerea* sur haricot (Nelson and Powelson, 1988), vigne (Latorre *et al.*, 1997; O'Neill *et al.*, 1996; Sean *et al.*, 1999), fraise (Tronsmo and Dennis, 1977) et diverses cultures sous abris (Elad *et al.*, 1995). Les champignons *Ulocladium atrum* et *Gliocladium roseum* ont été utilisés pour inhiber la germination des conidies et le développement de *B. cinerea* sur le cyclamen (Köhl and Fokkema, 1993; Köhl *et al.*, 1998). Des travaux menés par l'unité de pathologie végétale à l'INRA d'Avignon depuis 1990 ont montré que le champignon *Microdochium dimerum* souche L13 a une bonne efficacité pour protéger les plaies d'effeuillage et les feuilles de plants de tomates contre les attaques de *B. cinerea* en cultures sous abris (Bardin *et al.*, 2008; Nicot *et al.*, 2003). L'isolat 1-112 de la bactérie *Pseudomonas chlororaphis* et l'isolat IC1270 de la bactérie *Enterobacter agglomerans* (renommée *Serratia plymuthica*), tous deux

producteurs de pyrrolnitrine sont également des antagonistes de *B. cinerea* (Chernin *et al.*, 1996; Gulati *et al.*, 1999). Dans des tests en boîte de Pétri, la croissance mycélienne de *B. cinerea* est réduite de 85% en présence de l'isolat 1-112 de la bactérie *Pseudomonas chlororaphis* (Gulati *et al.*, 1999). L'application de la bactérie *Serratia plymuthica* IC14 sur les feuilles de concombre réduit l'incidence de *B. cinerea* de 76 % en conditions de serre (Kamensky *et al.*, 2003). Un certain nombre de levures (dont *Pichia* et *Rhodotorula*) et de bactéries (dont *Bacillus* et *Pseudomonas*) ont également été signalées pour leur efficacité dans le contrôle de *B. cinerea* en traitement post-récolte (Buck and Jeffers, 2004; De Meyer and Hofte, 1997; Elad *et al.*, 1994b; Guetsky *et al.*, 2002).

2.3.2. Mode d'action des agents de protection biologique

Les modes d'action impliqués dans la protection biologique de la plante contre l'infection par *B. cinerea* sont nombreux. L'implication de deux ou plusieurs mécanismes a été démontrée pour plusieurs agents de protection biologique (pour revue, voir Elad, 1996; Jacobsen, 2006). Cependant pour certains agents de protection biologique, leur mode d'action n'est pas précisément défini.

2.3.2.1. Antibiose

Dans le cas d'un mode d'action par antibiose, l'organisme antagoniste produit des métabolites secondaires toxiques pour l'agent pathogène cible. Ces métabolites produits à faibles concentrations peuvent inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents pathogènes (Montesinos *et al.*, 2009). L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de protection biologique (Jacobsen, 2006). Haas et Kell (2003) ont décrit les conditions de production optimale de ces composés *in vitro*. La production semble optimale dans le cas d'une densité élevée de cellules bactériennes et dans des conditions d'une croissance limitée. Il existe de nombreux exemples de bactéries et de champignons producteurs de composés toxiques. Des substances responsables de l'antibiose ont pu être caractérisées chez des souches appartenant à diverses espèces d'agents de lutte biologique (notamment *Bacillus subtilis*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas fluorescens*), et les gènes impliqués dans la production de certaines de ces substances ont été identifiés (Duffy *et al.*, 2003; Raaijmakers *et al.*, 2002). Les espèces de *Pseudomonas* par exemple produisent de nombreuses substances antifongiques: pyoverdine, pyoluteorine, phenazine, pyrrolnitrine, 2,4-diacetylphloroglucinol (Haas and Keel, 2003; Thomashow, 1996). L'antibiotique gramicidine S sécrété par l'agent de protection biologique *Brevibacillus brevis* (nommé auparavant

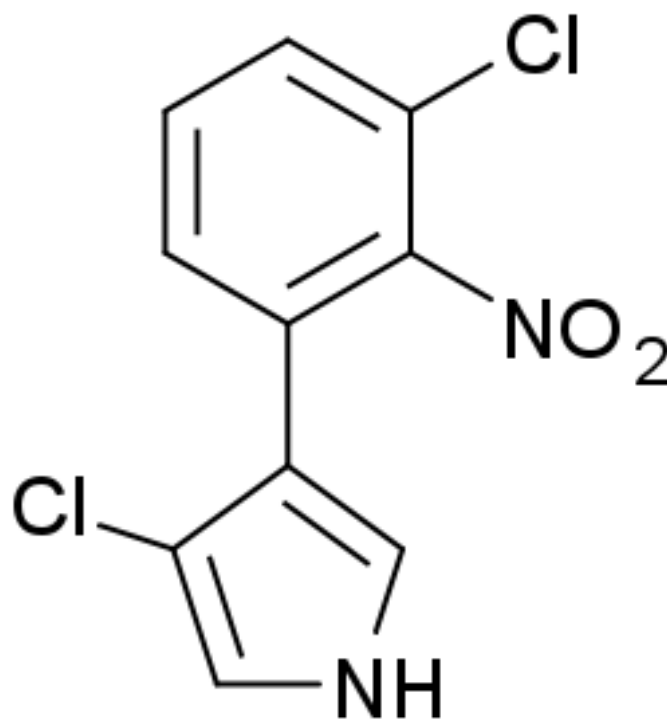


Figure 6. Structure de la pyrrolnitrine (3-Chloro-4-(3-chloro-2-nitrophenyl)pyrrole).

Bacillus brevis) inhibe par exemple la germination et la croissance mycélienne de *B. cinerea* (Edwards and Seddon, 2001; Haggag, 2008).

La pyrrolnitrine (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl)-pyrrole) (figure 6) est un antibiotique à large spectre d'action isolé pour la première fois dans les années soixante à partir de *Pseudomonas pyrrocinia* (Arima *et al.*, 1965; Arima *et al.*, 1964). Par la suite, ce composé a été isolé chez plusieurs autres espèces de bactéries, incluant *Myxococcus fluvus*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia sp.*, ainsi que plusieurs espèces de *Pseudomonas* et *Burkholderia* (El-Banna and Winkelmann, 1998; Hammer *et al.*, 1997; Meziane *et al.*, 2006). Cet antibiotique inhibe la croissance des champignons en bloquant le système respiratoire (Janisiewicz *et al.*, 1991). La production de cet antibiotique par *P. fluorescens* et *B. cepacia* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes de plantes comme *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* et *Fusarium oxysporum* (Cartwright *et al.*, 1995; Upadhyay and Srivastava, 2008). Cet antibiotique est synthétisé via l'action de quatre gènes, *prnA*, *prnB*, *prnC* et *prnD* chez *Pseudomonas fluorescens* (Hammer *et al.*, 1997; Kirner *et al.*, 1998). Lorsqu'ils sont transférés chez *Escherichia coli*, ces gènes permettent la synthèse de pyrrolnitrine (Hammer *et al.*, 1997; Kirner *et al.*, 1998). Ils codent pour quatre enzymes responsables de quatre étapes biochimiques menant à la synthèse du composé à partir du tryptophane (Hammer *et al.*, 1999; Hammer *et al.*, 1997; Kirner *et al.*, 1998). Cette voie métabolique est conservée entre *P. fluorescens*, *B. cepacia*, *P. pyrrocinia* et *M. fluvus*. A l'exception de *prnA* chez *M. fluvus*, les séquences déduites d'acides aminés partagent une similarité de plus de 59%, ce qui indique que la voie de biosynthèse de la pyrrolnitrine est bien conservée au niveau biochimique (Hammer *et al.*, 1999). Les études moléculaires du gène *prnD* chez *P. fluorescens*, *P. pyrrocinia*, *B. cepacia* et *M. fluvus*, a permis de déceler une variabilité dans la séquence de ce gène entre les différentes espèces (de Souza and Raaijmakers, 2003). La pyrrolnitrine s'avère efficace pour lutter contre *B. cinerea*. Par exemple, la pyrrolnitrine a été testée pour le contrôle des infections de roses en post-récolte par *B. cinerea* (Hammer *et al.*, 1993). Le trempage des tiges avec 100 mg/L réduit le développement des lésions d'environ 90% par rapport à des fleurs témoins non traitées (Hammer *et al.*, 1993). L'un des composés produit par *Pseudomonas chlororaphis* et responsable de l'activité antagoniste contre *B. cinerea* est la pyrrolnitrine (Gulati *et al.*, 1999). La production de la pyrrolnitrine est également un des modes d'action employé par les bactéries *Enterobacter agglomerans* (renommée *Serratia plymuthica*) contre cet agent pathogène (Chernin *et al.*, 1996; Kamensky *et al.*, 2003). Ce métabolite très actif a également connu un usage médical pour le traitement des mycoses cutanées comme *Trichophyton rubrum* et *Epidermophyton floccosum* (Shadomy, 1971). Dans

le domaine agricole, un dérivé de la molécule, le fludioxonil, a été développé comme fongicide (Leroux, 2004).

2.3.2.2. Hyperparasitisme

Dans le cas de l'hyperparasitisme, l'antagoniste est un parasite et reconnaît spécifiquement sa cible, pénètre dans ces cellules et entraîne sa destruction *via* la colonisation de ses organes. *Coniothyrium minitans* est par exemple un champignon hyperparasite de *Sclerotinia sclerotiorum*, capable de produire des enzymes dégradant les parois cellulaires de l'agent pathogène, telles que des chitinases ou des β -1-3 glucanases (Whipps and Gerlagh, 1992). L'observation en microscopie de l'interaction entre *Gliocladium roseum* et *B. cinerea* sur tiges de framboisiers a montré que la protection résultait de la colonisation des conidies et des hyphes de l'agent pathogène par l'antagoniste (Yu and Sutton, 1997). Ce mode d'action a aussi été décrit chez *Gliocladium catenulatum* (Simay, 1988). Enfin, *Pythium periplocum* s'est révélé être un mycoparasite de *B. cinerea* (Paul, 1999). L'usage en protection biologique d'hyperparasites a des contraintes comme la nécessité d'un contact direct avec l'agent pathogène et la lenteur possible de la destruction de ce dernier (Fravel, 2005).

2.3.2.3. Compétition nutritive

Le champignon *B. cinerea* est très sensible à l'absence de nutriments: il a, par exemple, besoin de nutriments d'origine extérieure pour assurer la germination de ses spores (Elad, 1996) (voir ci-dessus paragraphe 1.5.1). Certains microorganismes (bactéries, levures, champignons filamenteux) peuvent ainsi inhiber la germination des conidies de cet agent pathogène *via* la compétition pour des éléments nutritifs comme l'azote, le carbone, ou des macro- ou micro-éléments présents dans le milieu (Blakeman and Fokkema, 1982; Elad and Stewart, 2004; Filonow, 1998). La réduction de la concentration en nutriments dans le milieu conduit généralement à un taux réduit de spores germées de l'agent pathogène et un ralentissement de la croissance mycélienne, réduisant ainsi le nombre d'infections et l'expansion des lésions (Blakeman, 1993; Blakeman and Fokkema, 1982). La compétition pour les nutriments ou l'espace a été établie pour différentes levures appliquées sur pommes en traitements post-récoltes, comme par exemple *Candida* spp. (McLaughlin *et al.*, 1990), *Cryptococcus laurentii* (Roberts, 1990), *Sporobolomyces roseus* (Janisiewicz *et al.*, 1994) et *Candida oleophila* (Mercier and Wilson, 1994). Le champignon antagoniste *Trichoderma harzianum* souche T39 inhibe aussi la germination des conidies de *B. cinerea* en rentrant en compétition pour les nutriments à des stades précoces de l'interaction (Zimand *et al.*, 1996). De même, plusieurs

souches bactériennes et fongiques réduisent la germination des conidies de *B. cinerea* ce qui réduit la gravité des symptômes de la pourriture sur des feuilles détachées de tomate et de haricot (Elad *et al.*, 1994b; Zimand *et al.*, 1996). La bactérie *Pseudomonas* sp. peut, par exemple, utiliser les acides aminés plus vite que les conidies de *B. cinerea*, empêchant ces dernières de germer (Brodie and Blakeman, 1975).

2.3.2.4. Interférence avec le pouvoir pathogène

Au cours de la première phase de l'interaction hôte-pathogène, la synthèse d'enzymes hydrolytiques par *B. cinerea* est cruciale pour le processus d'infection (Baarlen *et al.*, 2004). Les agents de protection biologique peuvent interférer avec les facteurs du pouvoir pathogène de champignons en inhibant ou dégradant certaines enzymes hydrolytiques (cutinases, pectinases, etc.) (Duffy *et al.*, 2003). L'interférence avec le pouvoir pathogène a été signalée chez *T. harzianum* T39: l'activité de différentes enzymes (polygalacturonase, pectine méthyle estérase et pectate lyase, chitinase, β -1,3-glucanase et cutinase) produites par *B. cinerea* est réduite en présence de *T. harzianum* T39 (Kapat *et al.*, 1998a; Zimand *et al.*, 1996). En conséquence, le taux de pénétration de *B. cinerea* dans les tissus de l'hôte et l'impact de la maladie sont significativement réduits. Sur les feuilles de différentes plantes, *T. harzianum* T39 est également capable de sécréter une protéase entraînant une réduction de la germination des spores de *B. cinerea*, ce qui altère ainsi son pouvoir pathogène (Elad and Kapat, 1999). Paul *et al.*, (1997) montrent aussi que la bactérie *Bacillus circulans*, réduit *in vitro* l'activité pectinolytique de *B. cinerea* et en conséquence son infection sur vigne. Certains microorganismes peuvent avoir un effet indirect sur la mise en place de la pathogénèse en modifiant par exemple le pH du milieu. L'activité pectinolytique de *B. cinerea* est optimale à un pH acide (Manteau *et al.*, 2003; Schoonbeek *et al.*, 2007). Des pH alcalins entraînent une réduction de l'efficacité des enzymes de dégradation des tissus de la plante produites par *B. cinerea* (Manteau *et al.*, 2003). Certains microorganismes antagonistes, comme *Bacillus pumilus* et *P. fluorescens*, modifient le pH du milieu (Swadling and Jeffries, 1998). Ces bactéries interfèrent ainsi de façon indirecte avec le pouvoir pathogène de *B. cinerea* (Swadling and Jeffries, 1998). Enfin, des microorganismes dégradant l'acide oxalique, molécule produite par *B. cinerea* lors de son interaction avec la plante, peuvent protéger le concombre, la tomate, la vigne et *Arabidopsis thaliana* contre des attaques de *B. cinerea* (Schoonbeek *et al.*, 2007).

2.3.2.5. Modification des propriétés de surface des feuilles de la plante

Certaines bactéries possèdent la capacité de changer les caractéristiques de surface des feuilles des plantes. Ceci a pour conséquence de gêner le processus d'attachement et de croissance des agents pathogènes sur les feuilles (Bunster *et al.*, 1989). Par exemple, certains microorganismes comme *Pseudomonas* spp. sont capables de modifier la mouillabilité de la surface des feuilles et d'interférer ainsi avec le développement de certains agents pathogènes (Bunster *et al.*, 1989). *Bacillus brevis* entraîne l'extension et le dessèchement des gouttes d'eau sur les feuilles de choux chinois, diminuant les périodes d'humidité sur les feuilles et empêchant ainsi l'apparition de conditions favorables pour le développement de *B. cinerea* (Edwards and Seddon, 1992).

2.3.2.6. Stimulation des défenses de la plante

Dans le cas d'une interaction entre un agent pathogène et une plante, une succession d'événements se met en place. Ceci commence par la reconnaissance des deux partenaires, suivie de la transduction de signaux émis à l'interface et qui vont conditionner la réponse finale, à savoir la mise en place de réactions de défense chez la plante. La résistance induite chez la plante est un mode d'action de certains agents de protection biologique (Sequeira, 1983). La résistance peut être induite localement ou elle peut être systémique (Elad and Stewart, 2004). La résistance systémique induite, causée par divers agents de protection biologique, peut protéger la plante contre certains agents pathogènes du sol et aériens (Paulitz and Matta, 2000). Cette résistance chez la plante peut être déclenchée par des microorganismes non pathogènes tels que les saprophytes, ou des souches non virulentes des agents pathogènes. Cette résistance peut s'établir de différentes façons chez la plante: épaissement des structures pariétales renforçant leur rôle de barrière physique, stimulation de voies métaboliques secondaires permettant la synthèse de substances antimicrobiennes (comme les phytoalexines) ou de composés impliqués dans la signalisation de l'agression vers d'autres cellules, voire à l'ensemble de la plante par systémie (acide salicylique, éthylène, acide jasmonique, etc.), enfin, accumulation de protéines de défense (ou protéines PR pour "Pathogenesis Related"). Ces protéines, associées à la réponse des plantes aux attaques des agents pathogènes, inhibent certaines enzymes impliquées dans le pouvoir pathogène des microorganismes (protéases, polygalacturonases), voir dégradent certaines de leurs structures vitales (structures pariétales et membranes plasmiques) (Klarzynski and Fritig, 2001). Cette résistance induite entraîne, dans certains cas chez la plante, une protection contre une attaque

multiple de plusieurs agents pathogènes (Elad and Stewart, 2004). L'induction de résistance systémique chez la plante est décrite chez certains *Trichoderma*, chez *Pythium oligandrum* et chez des bactéries (Lepoivre, 2003). Chez le haricot, *Pseudomonas aeruginosa* induit une résistance systémique contre *B. cinerea* (De Meyer *et al.*, 1998). *Trichoderma harzianum* induit une résistance contre *B. cinerea* chez la tomate, la laitue, le poivron, le haricot et le tabac (Elad *et al.*, 2004). L'efficacité de la protection est obtenue sur les parties supérieures de la plante, que les agents de protection biologique soient appliqués dans le sol ou sur les feuilles inférieures de la plante (De Meyer *et al.*, 1998; Elad *et al.*, 2004). Récemment, différentes souches bactériennes ont été isolées à partir de la rhizosphère et de différentes parties de la vigne. Ces souches ont été caractérisées comme agents de la protection efficace contre *B. cinerea* dans des conditions *in vitro* et identifiées comme *Acinetobacter lwoffii* PTA-113 et PTA-152, *Bacillus subtilis* PTA-271, *Pantoea agglomerans* PTA-AF1 et PTA-AF2 et *Pseudomonas fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2 (Trotel-Aziz *et al.*, 2008). Les effets protecteurs observés semblent être liés pour une grande part à un effet inducteur de certaines réactions de défense de la vigne. Des cellules mortes de certains antagonistes bactériens ou fongiques (*T. harzianum* par exemple), sont capables d'induire une résistance locale et la réduction de la pourriture grise sur le haricot vert, la tomate, le poivron et le tabac (De Meyer *et al.*, 1998; Elad and Kapat, 1999). L'efficacité des ces cellules mortes à induire la résistance et réduire l'infection de *B. cinerea* est semblable aux cellules vivantes, dans certains cas (Elad and Kapat, 1999; Elad *et al.*, 1994a). Cette propriété présente un avantage pratique pour la mise en place de ces agents de protection biologique au champ.

2.3.2.7. Combinaison de mécanismes d'action

Dans certains cas, on peut penser que le contrôle biologique est la résultante de plusieurs modes d'action combinés. Le cas le plus étudié concerne le champignon *Trichoderma* pour lequel différents modes d'action ont été mis en évidence pour une même souche antagoniste, associant par exemple hyperparasitisme et antibiose (Lorito *et al.*, 1993; Tronsmo and Dennis, 1977). *Trichoderma harzianum* T39 combine à la fois la compétition nutritive, l'interférence avec le pouvoir pathogène de *B. cinerea* et l'induction de résistance de la plante (De Meyer *et al.*, 1998; Kapat *et al.*, 1998b). Le mode d'action de la levure *Candida saitoana* impliquée dans la protection post-récolte de fruits combine à la fois compétition nutritive et pour l'espace, hyperparasitisme et induction de résistance (El-Ghaouth *et al.*, 2001). *Brevibacillus brevis* utilise à la fois un antibiotique, la gramicidine S et un biosurfactant comme mode

Tableaux 3. Exemple de produits de lutte biologique commercialisés dans le monde pour la lutte contre *Botrytis cinerea* (d'après Elad and Stewart, 2004 ; Fravel, 2005)

Nom de produit	Antagoniste	Utilisation	Fabricant/Pays
Trichodex	<i>Trichoderma harzianum</i>	En vignes et en cultures sous serre	Makhteshim, Israël
Binab	<i>Trichoderma harzianum</i> et <i>Trichoderma polysporum</i>	Culture de fraise	Binab Bio-Innovation AB, Suède
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	En serre sur concombre, tomate, poivron, laitue et plantes ornementales	Kemira Gro Oy, Finlande
Plantshield	<i>Trichoderma harzianum</i>	Culture sous serre	BioWorks Inc, Etats-Unis
Botry-Zen	<i>Ulocladium oudemansii</i>	Vignes	Botry-Zen Ltd, Nouvelle-Zélande
Aspire	<i>Candida oleophila</i>	Fruits après récolte	Ecogen, Etats-Unis
Yield Plus	<i>Cryptococcus albidus</i>	Fruits après récolte	Anchor Yeast, Cape Town, Afrique du Sud
Bio-save	<i>Pseudomonas syringae</i>	Fruits après récolte	Eco Science Corp, Etats-Unis
Serenade	<i>Bacillus subtilis</i>	Cultures sous serre et de plein champ	Agra Quest, Etats-Unis

d'action contre *B. cinerea* (Edwards and Seddon, 1992; McHugh and Seddon, 2001). Dans le cas de la combinaison de modes d'action chez un agent de lutte biologique, le rôle et l'importance précis de chacun des modes d'action dans le contrôle de la maladie n'est souvent pas connu.

Les souches IC1270 et IC14 de *Serratia plymuthica* produisent de la pyrrolnitrine et des enzymes chitinolytiques (Meziane *et al.*, 2006). Aucune preuve de l'implication d'un de ces deux modes d'action dans le contrôle de *Penicillium digitatum* et *P. italicum* en post-récolte sur l'orange, n'a été mise en évidence jusqu'à présent. Il semblerait même que d'autres modes d'action seraient responsables du contrôle de ces champignons pathogènes. En effet, dans le cas de la souche IC1270, Meziane *et al.*, (2006) suggèrent que la compétition pour les nutriments est le principal mode d'action plutôt que la production de pyrrolnitrine ou d'enzymes chitinolytiques. Pour la souche IC14, le mécanisme d'inhibition de la germination des spores n'est pas clair (Meziane *et al.*, 2006). Cette inhibition est observée lorsqu'il y a un contact direct entre la bactérie et les spores du champignon, mais pas quand il y a un filtre permettant l'échange de nutriments et de métabolites entre les deux. Les enzymes chitinolytiques ne sont apparemment pas en cause, car l'inhibition complète de la germination des spores a également été observée avec le mutant déficient en enzymes (Meziane *et al.*, 2006). Même si ces antagonistes semblent combiner différents modes d'action, le rôle et l'importance précis de chacun des modes d'action identifiés dans le contrôle de *Penicillium digitatum* et *P. italicum* en post-récolte sur l'orange ne sont donc pas clairs.

2.3.3. Produits commercialisés

Une liste de produits de lutte biologique commercialisés sur l'ensemble des maladies de plantes a été proposé par Fravel en 2005 (Fravel, 2005). Contre *Botrytis*, un nombre élevé d'agents de protection biologique a été identifié en laboratoire au cours de ces dernières années, mais très peu de ces agents ont été mis sur le marché (Decoin *et al.*, 2002; Elad and Stewart, 2004; Fravel, 2005; Paulitz and Belanger, 2001). A notre connaissance, seuls 9 produits de protection biologique sont commercialisés dans le monde pour lutter contre *B. cinerea* (Tableau 3). Le champignon *T. harzianum* est présent dans 3 des formulations élaborées sur les 9 produits commercialisés. En France, seul Serenade, contenant la souche QST 713 de *Bacillus subtilis*, est homologué pour utilisation contre *B. cinerea* sur la vigne (catalogue ACTA, 2008; <http://e-phy.agriculture.gouv.fr>). D'autre part, à notre connaissance, d'autres produits sont en cours d'homologation. L'INRA a, par exemple, concédé à la société Agrauxine une licence d'exploitation de la souche L13 de *Microdochium dimerum* pour

qu'elle développe et mette sur le marché le produit AntiBot (http://www.inra.fr/les_partenariats/collaborations_et_partenaires/entreprises/en_direct_des_labos/developpement_de_methodes_de_protection_biologique_pour_la_production_de_tomates).

2.3.4. Facteurs d'efficacité de la lutte biologique contre *B. cinerea*

2.3.4.1. Contexte environnemental rencontré

Beaucoup d'études ont prouvé la bonne efficacité de certains microorganismes pour inhiber ou ralentir le développement de *B. cinerea*. Mais la plupart de ces études ont été effectuées dans des conditions contrôlées, souvent en laboratoire (Jacobsen, 2006). Cette 'bonne' efficacité n'est pas garantie en culture où les conditions de l'environnement sont beaucoup plus fluctuantes. Les conditions environnementales sont généralement imprévisibles et peuvent influencer la survie, la mise en place et l'activité des agents de lutte biologique (Jacobsen, 2006). Pour les maladies des cultures de plein champ, l'absence de fiabilité de l'efficacité des agents de protection biologique est souvent rapportée (Paulitz and Belanger, 2001). Pour les cultures sous abris, une enquête sur 60 serres non chauffées de tomates et de concombres a, par exemple, révélé que dans environ 30% des cas, *T. harzianum* T39 n'a pas pu contrôler les attaques de *B. cinerea* (Shtienberg and Elad, 1997). L'effet du microclimat a été testé en conditions contrôlées sur l'efficacité des champignons antagonistes *Microdochium dimerum* et *Ulocladium atrum*, sélectionnés pour leur capacité à protéger la tomate contre *B. cinerea* (Fruit, 2001; Nicot *et al.*, 2002). Ces auteurs montrent que, pour les deux champignons, l'effet du microclimat ne s'exprime pas de façon identique pour toutes les composantes de l'efficacité de la protection. Par exemple, sur la capacité à inhiber l'infection de la plaie d'effeuillage, le facteur prépondérant est la température et non l'humidité relative. L'efficacité sur plante est significativement réduite à 10°C et augmente avec la température de façon similaire pour *M. dimerum* et *U. atrum* bien que leurs profils de développement *in vitro* soient différents. Les autres composantes d'efficacité étudiées sont peu influencées par le microclimat (capacité à retarder l'apparition de lésions sur les plaies d'effeuillage, capacité à ralentir l'expansion des lésions sur tige une fois une infection déclarée) (Fruit, 2001; Nicot *et al.*, 2002). D'autres exemples montrant l'effet des facteurs microclimatiques sur l'efficacité de la lutte biologique existent dans la littérature scientifique. *Trichoderma harzianum* T39 est par exemple moins efficace pour contrôler *B. cinerea* sur concombre dans des conditions humides et si la température est inférieure à 20°C, que dans des conditions sèches et à des températures plus élevées (Elad *et al.*, 1993). De même, une température journalière élevée et une humidité

relative élevée dans la nuit sont associées à une réduction de l'efficacité de *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus albidus* et *T. harzianum* T39 pour contrôler *B. cinerea* sur concombre et tomate (Dik and Elad, 1999). En conditions de cultures commerciales, en plus des fluctuations de la température et de l'humidité relative, les agents de protection biologique sont soumis à des variations de pression de vapeur, à la présence de différentes sortes de gaz et à la circulation de l'air qui peuvent influencer sur leur efficacité à la surface des feuilles (Burrage, 1971).

Les exsudats chimiques présents à la surface des plantes contiennent des sucres, des composés pectiques, des acides aminés et des acides organiques (Elad and Stewart, 2004). Ces éléments changent régulièrement et ces changements peuvent affecter directement la microflore des feuilles ou avoir un impact indirect en modifiant par exemple l'état métabolique, la morphologie et la chimie de la surface des feuilles (Cutter, 1976). Comme les éléments nutritifs fluctuent, il y a en conséquence des changements dans la communauté des bactéries, des levures et des champignons filamenteux dans la phyllosphère (Blakeman, 1985). Ces changements peuvent affecter de manière significative, que ce soit bénéfique ou non, la colonisation et le potentiel de lutte biologique des agents de protection biologique. Ainsi, la présence de microflore naturelle peut être bénéfique ou préjudiciable pour la lutte biologique. Mercier et Wilson (1994), montrent par exemple que la présence de la microflore naturelle sur les blessures de pomme peut, dans certains cas, être bénéfique pour améliorer l'efficacité de la levure *Candida oleophila* contre *B. cinerea*.

La nutrition azotée des plantes peut également affecter l'efficacité de la lutte biologique, probablement en modifiant la composition chimique des éléments présents à leur surface. Ainsi, par exemple, la production d'acide rhodotorulique, un siderophore synthétisé par des isolats de *Rhodotorula*, est augmentée de 60% en présence d'urée comme source d'azote. Cela permet d'augmenter son activité antifongique *in vitro* contre *B. cinerea* (Calvente *et al.*, 2001).

2.3.4.2. Qualité du produit biologique

L'efficacité de la protection assurée par un agent microbien dépend de facteurs liés au produit lui-même, à son mode d'application, à sa rémanence, à sa compétence écologique et à son mécanisme d'action (Elad and Stewart, 2004). Pour ces facteurs, les produits microbiens ont des points communs avec les produits chimiques mais avec cependant quelques particularités. Ils doivent contenir une quantité suffisante de cellules vivantes en sortie de production (c'est

l'équivalent du taux de matière active), mais surtout lors de leur utilisation (Elad and Stewart, 2004). Cette dernière valeur dépend de la capacité de survie du micro-organisme, de son mode de protection et de sa formulation (Elad and Kirshner, 1992). Un effet de la dose d'application des antagonistes microbiens *Microdochium dimerum* et *Ulocladium atrum* sur leur efficacité sur tomate a été démontré (Decognet *et al.*, 1997; Fruit, 2001; Nicot *et al.*, 2002). Lorsque la concentration de l'antagoniste est 10 fois supérieure à celle de *B. cinerea*, la protection des plaies de tomate est très efficace quel que soit le régime microclimatique appliqué (Fruit, 2001; Nicot *et al.*, 2002).

L'efficacité de la protection biologique dépend aussi des conditions de transport et de stockage. L'exposition, même temporaire, à des températures excessives, peut dégrader gravement les biofongicides. Au-delà du nombre de cellules vivantes, l'efficacité dépend de leur type (cellules végétatives, spores) et de leur état physiologique notamment leur vitesse de reprise d'activité une fois appliquées (Fravel, 2005). La pureté du produit est aussi nécessaire (Decoin *et al.*, 2002).

La bonne répartition du produit sur la plante, la durée de son efficacité, sa capacité de survie, voire de multiplication sont également des qualités essentielles d'efficacité. Ces facteurs dépendent des caractéristiques propres de ces organismes (Decoin *et al.*, 2002). Ils peuvent être modifiés et améliorés par la formulation de l'agent de lutte biologique (Decoin *et al.*, 2002). Comme pour un produit chimique, l'application d'un micro-organisme actif par contact sera plus délicate que s'il agit à distance. Un atout important des biofongicides est qu'ils peuvent se multiplier et coloniser les surfaces à protéger donc compenser un éventuel manque de précision de l'application (Elad and Stewart, 2004). Mais la compétence écologique n'est souvent que très partiellement connue.

Une part importante de l'efficacité de la protection est liée aux mécanismes impliqués dans l'activité biologique du micro-organisme. Les différents modes d'action déterminés plus haut (paragraphe 2.3.2) peuvent être impliqués dans le contrôle de *B. cinerea*. Cependant, les modes d'action des agents de lutte biologique sont généralement déterminés par des études de laboratoire en conditions contrôlées. Dans certains cas, les conditions environnementales du milieu naturel peuvent influencer sur la mise en place de ces mécanismes d'action chez certains agents de lutte biologique. Par exemple, la production d'antibiotiques n'est pas forcément similaire en cultures *in vitro* et en condition 'naturelle'. Ainsi, les mêmes composés ne sont pas produits en quantité suffisante et présentent des niveaux de stabilité différents dans certaines conditions (Elad, 1996). L'activité et la production des antibiotiques dans la phyllosphère sont ainsi affectées par l'état physiologique de l'hôte et par les lixivats produits

(Elad, 1996). D'autre part, le mode d'action d'un antagoniste va influencer son mode d'utilisation en pratique. L'induction de résistance chez la plante requiert par exemple un délai entre l'application du produit et la mise en place de la résistance. Elle peut être un avantage en terme de régularité d'efficacité par son action à distance et sa persistance, même si la population microbienne décroît après l'induction. De plus, la capacité d'induction partielle de résistance par des cellules mortes de certaines bactéries antagonistes et *T. harzianum* suggère une efficacité du produit même en cas de réduction de la viabilité des spores lors de l'application (Elad and Kapat, 1999; Elad *et al.*, 1994a).

2.3.4.3. Variabilité naturelle de l'agent pathogène *B. cinerea*

L'efficacité des agents de lutte biologique est souvent étudiée sur une seule souche de l'agent pathogène cible et éventuellement sur un stade précis du cycle de vie de l'agent pathogène. Cependant, les populations d'agents pathogènes en général, et de *B. cinerea* en particulier, présentent une forte diversité phénotypique et génétique (voir paragraphe 1.6). Selon McDonald et Linde (2002), un des facteurs les plus importants pour qu'un agent pathogène contourne l'efficacité d'une méthode de lutte est lié à la composition de la population de l'agent pathogène, et en particulier, le fait d'avoir un grand nombre d'individus différents dans cette population. La nature multinucléée et hétérocaryotique de *B. cinerea*, la présence de transposons dans le génome, l'existence de particules "virus-like" et le possible recours à la reproduction sexuée peuvent expliquer le haut niveau de variabilité de ce champignon (Beever and Weeds, 2004). La capacité rapide d'acclimatation de ce champignon à une pression sélective est également avérée : ainsi après plusieurs générations du champignon sous film filtrant les UVs, Nicot *et al.*, (2001) ont mis en évidence une acclimatation à l'effet inhibiteur de la sporulation. En considérant ces caractères génétiques, on peut craindre une répercussion possible sur la régularité de l'efficacité de la protection biologique et sa durabilité. *Botrytis cinerea* est, par exemple, considéré comme un agent pathogène à 'haut risque' en terme de résistance aux fongicides et le développement de résistances aux produits chimiques a fréquemment été démontré (voir paragraphe 1.6, 2.1 et 3.2). La diversité de sensibilité à des agents de lutte biologique doit être prise en compte pour assurer une protection biologique efficace et durable. Cependant, encore peu de travaux tiennent compte de la diversité naturelle de *B. cinerea* pour évaluer l'efficacité d'agents de lutte biologique.

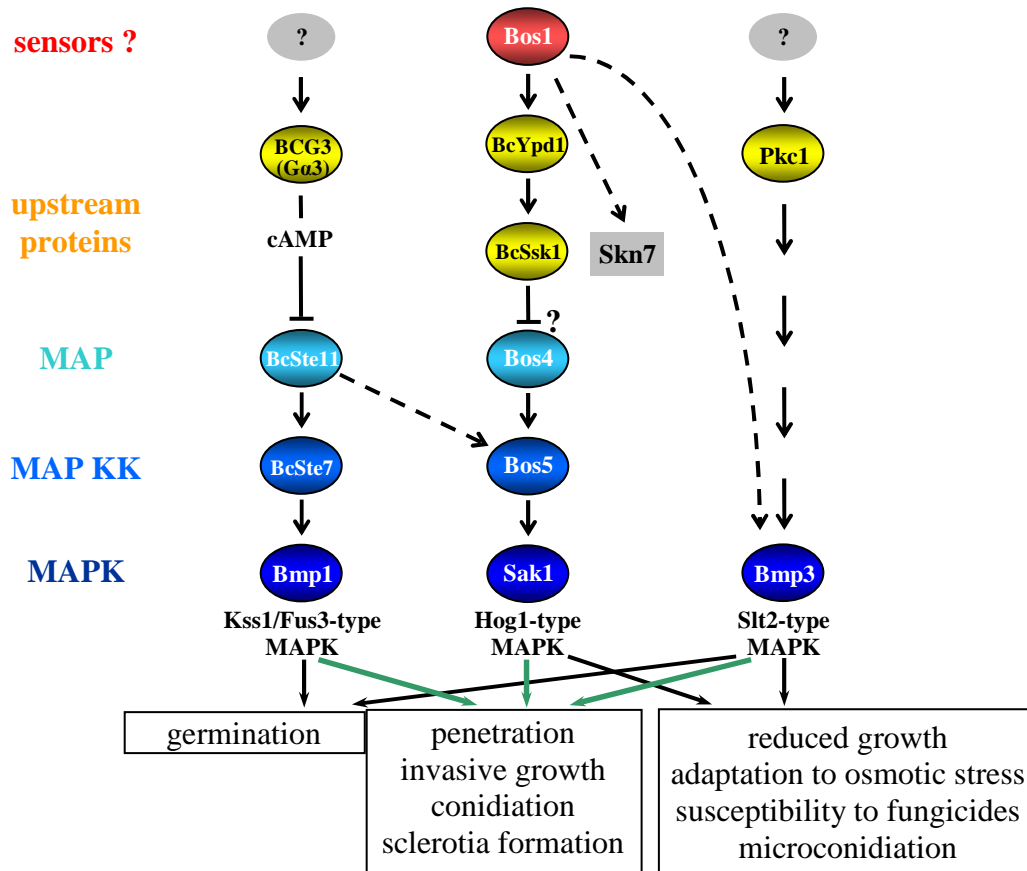


Figure 7. Voies MAP kinase de *Botrytis cinerea* avec les phénotypes associés. Voies de signalisation simplifiées impliquant les trois MAPK potentiels de *B. cinerea* avec leurs régulateurs (d'après Liu, 2008).

3. Durabilité des méthodes de contrôle de *B. cinerea*

3.1. Définition de la durabilité

La durabilité d'une méthode de lutte peut se définir par la persistance de son efficacité dans le temps et dans l'espace (Johnson, 1981). Cette efficacité dépend de la pression de sélection exercée par la méthode de lutte sur les populations parasites. Elle dépend également de la capacité des populations du parasite à s'adapter aux méthodes de lutte lorsque celles-ci sont déployées en culture (Johnson, 1979). Il est donc crucial de comprendre les déterminismes du contournement, c'est-à-dire les facteurs impliqués et leurs effets sur l'efficacité, mais aussi les conditions qui facilitent l'émergence et la diffusion de variants résistants dans les populations d'agents pathogènes.

3.2. Résistance de *B. cinerea* aux fongicides

L'inefficacité de la lutte chimique est généralement attribuée à l'apparition de souches résistantes de l'agent pathogène. Le développement de résistances aux fongicides chez *B. cinerea* est considéré comme un problème grave, cet agent pathogène étant qualifié "d'agents pathogènes à haut risque" (voir paragraphes 1.6 et 2.1) (Brent and Hollomon, 1998). Elad *et al.*, (1992a) ont par exemple montré que sur 12 sites étudiés, la résistance aux benzimidazoles et aux dicarboximides chez *B. cinerea* était observée dans 11 des 12 sites, et la résistance à la fois au carbendazim et au diethofencarb était observée dans 8 des 12 sites. Ce champignon est même capable de contourner des botryticides récemment homologués (Ziogas *et al.*, 2003).

Les mécanismes de résistance aux fongicides ont été largement étudiés (pour revue voir Leroux, 2004; Leroux *et al.*, 2002). Ces travaux ont abouti à la mise en évidence de différents gènes associés à la résistance aux fongicides anti-*Botrytis* (Leroux, 2004; Leroux *et al.*, 2002). Par exemple, la résistance aux dicarboximides, phenylpyrroles et hydrocarbures aromatiques, semble liée à la cascade mitogen-activated protein kinases (MAP kinase), impliquée dans la réponse des organismes aux stress (Figure 7) (Cui *et al.*, 2002; Leroux *et al.*, 2002). Les études génétiques menées par Faretra et Pollastro (1991) avec des isolats naturels et des mutants de laboratoire ont montré que la résistance de *B. cinerea* aux dicarboximides était déterminée par le gène *Daf1*, correspondant au gène *Bos1* ou *BcOS1* (Cui *et al.*, 2002). Ce gène a été cloné et séquencé dans différentes souches de *B. cinerea*, aboutissant à la démonstration que certaines mutations dans ce gène sont associées à la résistance aux dicarboximides (Leroux, 2004). D'autres gènes de la cascade MAP-kinase sont

vraisemblablement également impliqués dans les résistances spécifiques aux dicarboximides, phenylpyrroles ou hydrocarbures aromatiques tel que les gènes *Sak1*, *Skn7* (Figure 7) (Liu, 2008; Liu *et al.*, 2008).

D'autres mécanismes génétiques sont associée à la résistance multiple aux fongicides (multidrug resistance ou MDR) (Leroux, 2004), Des gènes codent pour des protéines membranaires appartenant à des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) ou MFS (Major Facilitators Super-family) (Leroux, 2004). Les transporteurs ABC sont capables de lier et hydrolyser des nucléotides tri-phosphates (principalement l'ATP) et d'utiliser l'énergie générée pour transporter une grande variété de composés à travers les membranes cellulaires (mécanismes d'efflux dépendant de l'ATP) (Balzi and Goffeau, 1994). Les transporteurs MFS n'hydrolysent pas l'ATP mais ils facilitent le transport de divers composés en utilisant l'énergie du gradient électrochimique des membranes (Balzi and Goffeau, 1994). Chez les champignons filamenteux, ces protéines membranaires sont capables de transporter une grande variété de composés naturels et synthétiques d'origine endogène ou exogène (Del Sorbo *et al.*, 2000; Stergiopoulos *et al.*, 2002). Le séquençage complet du génome de *B. cinerea* a révélé l'existence de 46 protéines putatives ABC et 13 des gènes ont été clonés (Vermeulen *et al.*, 2001; Yoder and Turgeon, 2001). Les traitements avec les fongicides peuvent accroître les niveaux de transcription de plusieurs de ces gènes, notamment *BcatrB*, *BcatrD*, *BcatrG* et *BcatrK* (Stergiopoulos *et al.*, 2002). Jusqu'à maintenant, trois gènes codant pour des transporteurs MFS (*Bcmfs1*, *Bcmfs2* et *Bcmfs4*) ont été caractérisées chez *B. cinerea* (Stergiopoulos *et al.*, 2002). Les traitements avec les fongicides anilinopyrimidine et les DMIs (inhibiteurs de la synthèse des stéroles) augmentent le taux de transcription de *Bcmfs1* (Leroux, 2004). Les résultats de Hayashi *et al.* (2002) démontrent que *Bcmfs1* est un transporteur MFS chez *B. cinerea* avec une fonction de résistance aux fongicides, capable de transporter à la fois des composés naturels et fongicides toxiques.

3.3. Résistance aux phytoanticipines et phytoalexines

Les champignons phytopathogènes sont capables de contourner l'effet de molécules antifongiques produites par les plantes. L' α -tomatine est un métabolite secondaire produit dans les feuilles de tomates et de fruits qui ne sont pas encore mûrs (Friedman 2002). L' α -tomatine a des effets antifongiques (Sandrock and VanEtten, 1998) et des effets insecticides (Kowalski *et al.*, 2000). Dans les années 1970, il a été signalé que l' α -tomatine inhibait la croissance mycélienne de *B. cinerea* mais avec aucun effet sur la germination des conidies (Verhoeff and Liem, 1975). Verhoeff et Liem (1975) sont les premiers à signaler que *B.*

cinerea a pu contourner l' α -tomatine en la transformant en tomatidine. Cela permet au champignon d'infecter les tissus de tomates avant la chute naturelle du niveau d' α -tomatine dans la plante (Verhoeff and Liem, 1975). Une étude sur 13 isolats de *B. cinerea* révèle que tous sauf un sont capable de dégrader cette molécule. Cet isolat, sensible à l' α -tomatine, a été isolé de raisin et n'est pas agressif sur la tomate, suggérant un rôle de cette molécule dans l'interaction entre l'agent pathogène et la tomate (Quidde *et al.*, 1998).

La capacité de *B. cinerea* à contourner le resvératrol a également été démontrée. La désintoxication du resvératrol est attribuée à sa dimérisation oxydative par des laccases produites par *B. cinerea* (Adrian *et al.*, 1998; Breuil *et al.*, 1999; Hoos and Blaich, 1990; Pezet *et al.*, 1991; Sbaghi *et al.*, 1996). Sbaghi *et al.*, (1996) ont démontré une corrélation entre la capacité des isolats de *B. cinerea* à désintoxiquer le resvératrol et leur virulence sur des feuilles de vigne. Cependant, plusieurs études ne confirment pas une relation entre l'accumulation du resvératrol et l'incidence de la maladie chez la vigne (Keller *et al.*, 2003; Magee *et al.*, 2002). Hoos et Blaich (1990), ont montré que l'augmentation de la concentration des conidies dans un milieu synthétique contenant du resvératrol a conduit à une augmentation du catabolisme du resvératrol et en conséquence à la survie des conidies. Dans le but de savoir si les transporteurs ABC jouent un rôle dans la protection de *B. cinerea* contre le resvératrol, Schoonbeek *et al.*, (2001) ont cloné le gène *BcatrB* codant pour un transporteur ABC chez *B. cinerea*. Ils ont remarqué que l'expression de *BcatrB* est augmentée après un traitement de *B. cinerea* avec le resvératrol. Les mutants n'ayant pas le gène *BcatrB* sont plus sensibles au resvératrol que les parents sauvages. Ces résultats indiquent que les transporteurs ABC sont des déterminants majeurs de la résistance de *B. cinerea* à ce composé de défense produit par les plantes (Schoonbeek *et al.*, 2001).

3.4. Adaptation aux films photosélectifs anti-UV

Comme indiqué dans le paragraphe 1.4.5, différentes études ont montré que les ultraviolets proches (300 à 400 nm) stimulent la production de spores chez *B. cinerea* (Epton and Richmond, 1980; Jarvis, 1992). Une souche de *B. cinerea* cultivée *in vitro* sous film filtrant les UV proches (film UV-sélectif) pendant plusieurs générations s'adapte progressivement aux conditions d'incubation (Nicot *et al.*, 2001). Dans cette étude, les auteurs ont confirmé qu'après 5 à 6 générations, la production de spores par la souche cultivée sous film UV-sélectif a été multipliée par 100. En fin d'expérimentation, la sporulation sous film UV-

sélectif atteint environ 2% de celle sous film témoin (Nicot *et al.*, 2001). Les mécanismes de moindre sensibilité de *B. cinerea* à l'absence d'UV ne sont pas connus.

3.5. Résistance à des antagonistes bactériens produisant des antibiotiques

Peu d'exemples de perte d'efficacité d'agents de lutte biologique contre *B. cinerea* ont été publiés. Les résultats obtenus par Li & Leifert (1994) suggèrent que *B. cinerea* est capable de développer une résistance contre la bactérie *Bacillus subtilis* CL27 après des traitements répétés sur des plantes d'*Astilbe hybrida*. Cet agent de protection biologique produit différents composés dont un antibiotique efficace contre *B. cinerea* (Leifert *et al.*, 1995). Après huit traitements successifs, l'efficacité de l'agent de lutte biologique a chuté de façon spectaculaire. Après le dixième traitement, la souche CL27 est devenue totalement inefficace dans le contrôle de *B. cinerea*. Des essais supplémentaires *in vitro* ont montré que les filtrats de culture de la souche CL27 ne sont plus capables d'inhiber la croissance du mycélium de *B. cinerea* (Li and Leifert, 1994). Buck, et Jeffers (2004) ont montré que l'efficacité de la levure *Rhodotorula glutinis* PM4 contre différentes souches de *B. cinerea* varie d'une manière considérable sur géranium. Ces auteurs ont remarqué qu'en présence de la levure, les diamètres de lésion sur les disques de feuilles de géranium allaient de 0,2 à 10,3 mm et que sur 29 isolats de *B. cinerea* testés, 3 isolats n'ont pas été inhibés par cette levure (Buck and Jeffers, 2004).

D'une manière générale, la résistance des champignons aux molécules fongitoxiques naturelles résulte d'une détoxification accrue de ces substances, d'une moindre pénétration intracellulaire ou de modifications qualitatives ou quantitatives des cibles (Duffy *et al.*, 2003). Le second mécanisme implique la surproduction de transporteurs membranaires de type ABC ou MFS et conduit souvent à la résistance multiple (MDR). Schoonbeek *et al.*, (2002) ont ainsi étudié le rôle des transporteurs ABC dans les interactions entre *B. cinerea* et *Pseudomonas* spp. Le 2,4-diacétylphloroglucinol (2,4-DAPG), le phénazine-1-acide carboxylique (PCA) et le phénazine-1-carboxamide (PCN), antibiotiques à large spectre produits par *Pseudomonas* spp., induisent l'expression de plusieurs gènes des transporteurs ABC chez *B. cinerea*. Les phénazines induisent l'expression du gène *BcatrB* (un des gènes de transporteurs ABC), et les mutants dont l'expression de *BcatrB* est déficiente sont significativement plus sensibles à ces antibiotiques que leur souche parentale. Les transporteurs ABC jouent donc un rôle important pour assurer la protection de *B. cinerea* contre les antibiotiques produits par *Pseudomonas* spp. (Schoonbeek *et al.*, 2002). L'analyse de mutants de laboratoire de *B. cinerea* significativement plus sensibles à l'antibiotique 2,4-

DAPG que la souche parentale, a permis de mieux comprendre les mécanismes de résistance à cet antibiotique (Schouten *et al.*, 2008). Schouten *et al.*, (2008) ont montré que la pompe à efflux BcAtrB assure la première ligne de défense de *B. cinerea* contre l'antibiotique, en empêchant son accumulation dans la cellule à des concentrations toxiques, alors que la laccase extracellulaire BcLCC2 sert d'intermédiaire à la dégradation du 2,4-DAPG, en passant par une conversion en acide tannique. L'expression de *BcatrB* est induite par le 2,4-DAPG et l'efflux donne à *B. cinerea* un temps suffisant pour déclencher le processus de dégradation de l'antibiotique *via* le médiateur BcLCC2 (Schouten *et al.*, 2008).

Les résultats de ces études indiquent que les transporteurs ABC fongiques peuvent jouer un important rôle dans les interactions entre les bactéries produisant des antibiotiques et *B. cinerea*. L'implication de ces mécanismes de défense chez *B. cinerea*, déjà impliqué dans la résistance aux fongicides, peut mettre à mal la durabilité de l'efficacité des agents de protection biologique quand ceux-ci seront utilisés de façon massive.

4. Pertes d'efficacité de la protection biologique

4.1. Protection contre les ravageurs invertébrés

Des résistances aux insecticides se développent invariablement chez les insectes ravageurs (Alyokhin *et al.*, 2008; Oyarzun *et al.*, 2008). En ce qui concerne les "bio-insecticides" des phénomènes de résistance ont également été décrits (McGaughey and Whalon, 1992). La résistance à *Bacillus thuringiensis*, le bio-insecticide microbien le plus largement utilisé, a été constatée à maintes reprises. McGaughey (1985) a par exemple constaté que l'insecte *Plodia interpunctella*, un lépidoptère ravageur majeur des grains en stockage, peut développer une résistance au bio-insecticide après quelques générations de traitement avec celui-ci. Pour une population élevée sur de la nourriture traitée avec *B. thuringiensis*, le niveau de résistance augmente de près de 30 fois en seulement deux générations (cycles). Après 15 générations, la résistance est 100 fois plus élevée que chez l'insecte témoin (McGaughey, 1985). Cette situation de résistance a été observée également par Tabashnik (1994) qui a démontré que les insectes *Plodia interpunctella*, *Heliothis virescens*, *Cadra cautella*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, *Trichoplusia ni*, *Leptinotarsa decemlineata* et *Chrysomela scriptu* peuvent développer une résistance à la bactérie *B. thuringiensis*. Des observations de pertes d'efficacité ont également été mises en évidence au champ. L'utilisation massive de *B. thuringiensis* pendant plus de deux décennies contre les insectes lépidoptères au champ a ainsi révélé une adaptation à la bactérie (McGaughey and Whalon, 1992; Tabashnik, 1994).

Le virus de la granulose du carpocapse des pommes (CpGV) est un moyen de lutte efficace et sélectif contre l'espèce *Cydia pomonella* (Sauphanor *et al.*, 2006). Plusieurs produits à base de CpGV sont commercialisés et largement utilisés pour la production de pommes. On estime que ces produits sont appliqués sur plus de 100 000 ha en Europe (Eberle and Jehle, 2006) et sur 2 à 3 millions d'hectares dans le monde (Asser-Kaiser *et al.*, 2007), avec un marché en constante augmentation en raison de leur efficacité et leur sécurité environnementale (Eberle and Jehle, 2006). Cet insecticide microbiologique est parfois utilisé de façon quasi-exclusive dans les vergers en agriculture biologique (Berling *et al.*, 2009; Sauphanor *et al.*, 2006). Des échecs de protection ont été enregistrés ces dernières années en Allemagne et en France, faisant craindre l'apparition de carpocapses résistants au CpGV (Berling *et al.*, 2009; Fritsch *et al.*, 2005; Sauphanor *et al.*, 2006). Dans les vergers allemands, plus d'une douzaine de cas de résistance du carpocapse à CpGV ont été observés avec un facteur de résistance supérieur à 1000 (Asser-Kaiser *et al.*, 2007). En 2004, certaines populations d'insectes avec une faible sensibilité au virus ont été détectées pour la première fois dans le sud de la France (Berling *et al.*, 2009). En 2006, des analyses de laboratoire conduits sur des échantillons prélevés dans une vingtaine de localités confirment la perte de sensibilité au virus, de populations soumises à une sélection continue depuis plus de dix ans (Sauphanor *et al.*, 2006).

4.2. Protection contre les agents phytopathogènes

L'étude de la durabilité de la lutte biologique contre les maladies des plantes n'a reçu que peu d'attention jusqu'à récemment (Duffy *et al.*, 2003), et la plupart des études scientifiques réalisées dans ce domaine concernent principalement des agents de lutte biologique producteurs d'antibiotiques (Duffy *et al.*, 2003; Schouten *et al.*, 2004). Plusieurs études décrivent ainsi la tolérance d'agents pathogènes à des antibiotiques produits par des antagonistes bactériens et fongiques (Tableau 4). En revanche, la démonstration de la perte d'efficacité d'agents de lutte biologique en pratique est rare. Comme mentionné dans le paragraphe 3.5, le seul exemple concerne l'étude de Li et Leifert (1994), qui ont mis en évidence une résistance de *B. cinerea* à la souche CL27 de *Bacillus subtilis*, agent de lutte biologique producteur d'antibiotiques. Ces auteurs suggèrent que le champignon a développé une résistance contre l'antibiotique (ou les antibiotiques) produit par l'agent de lutte biologique et que cette résistance est apparue suite aux traitements répétés réalisés avec la bactérie.

D'autre part, des différences de sensibilité à des antibiotiques produits par des agents de lutte biologique ont été mises en évidence chez certains agents pathogènes cibles, et dans certains

Tableau 4. Exemples de mise en évidence de la variation de sensibilité des agents pathogènes aux composés produits par des agents de lutte biologique ou aux agents de lutte biologique eux mêmes. La plupart des exemples concerne la résistance à des antibiotiques produits par les agents de lutte biologique.

Mode d'action d'agent de lutte biologique	Agent pathogène	Antagoniste microbien	Mécanisme potentiel de résistance	Référence
Antibiose				
Agrocin 84	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Perte du plasmide Ti, transfert horizontal du plasmide	(Cooksey and Moore, 1982; Stockwell <i>et al.</i> , 1996)
2,4-diacetylphloroglucinol	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Dégradation	(Schouten <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	éjection du composé à l'extérieur de la cellule (flux actif par transporteurs ABC) + dégradation	(Schouten <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Pythium</i> spp. <i>Pythium deliense</i>	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	ND ND	(de Souza <i>et al.</i> , 2003) (de Souza, 2002)
Gliotoxin	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	Réduction de l'absorption	(Howell, 2003; Jones and Hancock, 1988)
Hydrogen cyanide	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Bactérie de sol	ND	(Wheatley, 2002)
	<i>Phanaerochaete magnoliae</i>	Bactérie de sol	Régulation de la synthèse d'antibiotiques (augmentation de la compétitivité)	(Mackie and Wheatley, 1999)
	<i>Phytophthora cryptogea</i>	Bactérie de sol	ND	(Wheatley, 2002)
1-hydroxyphenazine	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	<i>Pseudomonas</i>	Dégradation/detoxification des formes activées de l'oxygène	(Levy <i>et al.</i> , 1992)
Kanosamine	<i>Pythium</i> spp.	<i>Bacillus cereus</i>	ND	(Milner <i>et al.</i> , 1996)

Tableau 4. Suite

Mode d'action d'agent de lutte biologique	Agent pathogène	Antagoniste microbien	Mécanisme potentiel de résistance	Référence
Norfloxacine	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	éjection du composé à l'extérieur de la cellule (flux actif)	(Burse <i>et al.</i> , 2004)
phenazine-1-carboxamide	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	éjection du composé à l'extérieur de la cellule (flux actif par transporteurs ABC)	(Schoonbeek <i>et al.</i> , 2002)
phenazine-1-carboxylic acid	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	éjection du composé à l'extérieur de la cellule (flux actif par transporteurs ABC)	(Schoonbeek <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	ND	(Mazzola <i>et al.</i> , 1995)
	<i>Pythium ultimum</i> var. <i>sporangiiferum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ND	(Gurusiddaiah <i>et al.</i> , 1986)
Antibiotique non déterminé	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Bacillus subtilis</i> CL27	ND	(Li and Leifert, 1994), (Leifert <i>et al.</i> , 1995)
Production d'acides gras à activité antibiotique				
Acides gras	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>sp. radicleslycopersici</i>	<i>Sporothrix flocculosa</i>	ND	(Bélanger and Deacon, 1996; Benyagoub <i>et al.</i> , 1996)
Compétition nutritive				
-	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i> PM4	ND	(Buck and Jeffers, 2004)

ND = non défini

cas, les mécanismes de résistance ont été élucidés (Duffy *et al.*, 2003) (voir paragraphe 4.2 et tableau 4). Schouten *et al.*, (2004) ont ainsi testé 117 isolats naturels de *Fusarium oxysporum* pour leur sensibilité au 2,4-diacétylphloroglucinol (2,4-DAPG), un antibiotique à large spectre produit par plusieurs souches antagonistes de *Pseudomonas fluorescens*. Ils ont trouvé qu'environ 17% des souches de *F. oxysporum* sont relativement tolérantes à des concentrations élevées de 2,4-DAPG (Schouten *et al.*, 2004), suggérant une possible résistance de ces souches aux antagonistes producteurs de cet antibiotique. Soixante six isolats du champignon phytopathogène *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, agent causal du piétin-échaudage du blé, ont montré une diversité de sensibilité vis-à-vis de deux antibiotiques, phénazine-1-acide carboxylique (PCA) et 2,4-DAPG produit par *Pseudomonas* spp. (Mazzola *et al.*, 1995). Les résultats de cette étude suggèrent que l'agent pathogène exhibe une variation de sensibilité aux métabolites antifongiques produits par les agents de protection biologique. Cette variation de sensibilité avec l'existence de génotypes relativement moins sensibles de l'agent pathogène pourrait, dans certains cas, contribuer à une efficacité affaiblie de ces agents de protection biologique au champ (Mazzola *et al.*, 1995). La préexistence des souches de *G. graminis* var. *tritici* relativement insensibles aux antibiotiques PCA et 2,4-DAPG dans les populations naturelles pourrait avoir un impact négatif sur l'efficacité des agents de protection biologique qui produisent ces antibiotiques (Mazzola *et al.*, 1995). Il est également possible que l'utilisation massive d'agents de lutte biologique produisant du PCA ou du 2,4-DAPG sélectionne une population moins sensible voire résistante de l'agent pathogène à ces antibiotiques (Mazzola *et al.*, 1995). Un cas particulier de perte d'efficacité de la lutte biologique concerne le contrôle de la bactérie phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens*, provoquant la galle du collet, par la souche K84 d'*Agrobacterium radiobacter* (Penalver *et al.*, 1994; Vicedo *et al.*, 1993). Cette bactérie antagoniste contient un plasmide sur lequel est disposé un gène contrôlant la production de l'antibiotique agrocin 84 efficace contre la bactérie pathogène, et le gène de résistance à cet antibiotique (Penalver *et al.*, 1994; Vicedo *et al.*, 1993). Stockwell *et al.*, (1996) ont montré qu'il était possible de transférer le plasmide pAgK84 de l'agent de protection biologique *A. radiobacter* K84 vers l'agent pathogène *A. tumefaciens*. Ce transfert entraîne l'échec de la protection de l'agent pathogène par la bactérie antagoniste. En effet, l'agent pathogène *A. tumefaciens* devient résistant à l'antibiotique est n'est donc plus contrôlé efficacement par l'agent de lutte biologique (Stockwell *et al.*, 1996). Enfin une étude récente sur l'antagoniste *Rhodotorula glutinis* PM4 montre que les isolats de *B. cinerea* varient pour leur sensibilité à cette levure (Buck and Jeffers, 2004).

D'autres modes d'action ont été décrits chez les agents de lutte biologique pour contrôler les agents pathogènes dont la compétition pour les éléments nutritifs, l'hyperparasitisme, et la stimulation des défenses naturelles de la plante hôte. Aucune étude de durabilité de l'efficacité de la lutte biologique ne concerne des agents de lutte biologique utilisant ces autres modes d'action. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce déficit de données scientifiques:

- Il n'y a pas de perte d'efficacité des agents de lutte biologique contre les maladies des plantes! D'après Handelsman et Stabb (1996), la stabilité de l'efficacité de la lutte biologique s'explique par le fait qu'un agent de lutte biologique développe plusieurs mécanismes d'action pour contrôler la maladie, et que la résistance à de multiples mécanismes antagonistes devrait être relativement lente ou ne survenir qu'à une très faible fréquence. Cependant, les travaux scientifiques mettent souvent en évidence un seul mode d'action efficace contre un agent pathogène (Meziane *et al.*, 2006; Taczman-Bruckner *et al.*, 2005) (voir paragraphe 2.3.2.7). Dans les cas où les agents de lutte biologique développent plusieurs modes d'action contre un agent pathogène, plusieurs questions peuvent alors se poser: quel est le rôle et l'importance précise de chacun de ces modes d'action dans le contrôle de l'agent pathogène? Et est ce que l'efficacité de l'agent de lutte biologique est conservée si un des modes d'action est contourné? D'autre part, pour beaucoup d'antagonistes microbiens, leur mode d'action n'est pas précisément identifié.

- Il n'y a pas de pression de sélection suffisante pour que l'efficacité des agents de lutte biologique soit contournée. D'après Duffy *et al.*, (2003), les micro-organismes antagonistes exercent une pression de sélection limitée sur les agents pathogènes, car ils opèrent dans des microniches à la surface des plantes où seulement une partie de la population pathogène est exposée pendant une courte période de son cycle de vie. Ceci est vrai dans le cas d'une application ciblée de l'agent de lutte biologique sur une plante. Cependant, la plupart des produits biologiques commercialisés sont pulvérisés, à la manière de beaucoup de fongicides, sur l'ensemble du feuillage dans une parcelle de plantes et à des fréquences plus ou moins rapprochées. Par exemple, l'utilisation du produit biologique Serenade (souche QST 713 de *Bacillus subtilis*) contre les attaques de *B. cinerea* sur vigne est recommandée en pulvérisation sur l'ensemble du feuillage (voir ACTA, 2008 et <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>). L'ensemble de la population pathogène est alors exposé à l'agent de lutte biologique durant toute la culture de la plante. De plus, l'agent de lutte biologique peut survivre, s'installer, se multiplier, et se propager dans une culture et rester ainsi en contact continu avec l'agent pathogène. Dans ce cas, il pourra exercer une pression de sélection continue sur l'agent pathogène. Ainsi les agents de lutte biologique inoculés dans le sol, s'ils survivent, peuvent

rester en contact continue avec les agents pathogènes (Baysal *et al.*, 2008; Errakhi *et al.*, 2009).

- Les chercheurs mettant en évidence un échec de la protection biologique contre des agents pathogènes s'autocensurent! Cette autocensure peut être liée à une absence de volonté de présenter des résultats 'négatifs' (Duffy *et al.*, 2003). Par exemple, Holt & Hochberg (1997) estiment que tous les résultats ne sont vraisemblablement pas publiés dans le domaine de la protection biologique contre les insectes, et particulièrement dans le cas de la mise en évidence d'un échec de la protection. Hors l'observation d'un contrôle inefficace peut être liée à une évolution rapide des ravageurs aboutissant à une perte d'efficacité de cette méthode.

- Peu d'études sont réalisées dans ce domaine. La plupart des études sur la lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes concernent la recherche de nouveaux agents de contrôle, l'étude des mécanismes d'action mis en œuvre et des gènes impliqués dans l'interaction avec l'agent pathogène ou le suivi de la survie des agents de lutte biologique après leur introduction dans un environnement spécifique. En revanche, l'étude d'une adaptation possible des agents pathogènes à des agents de lutte biologique a encore reçu peu d'attention.

5. Objectifs de l'étude

5.1. Situation du sujet

Le contexte socio-économique est de plus en plus favorable à l'acceptation et la mise en œuvre de méthodes de lutte alternatives à la lutte chimique. La demande du consommateur pour une agriculture durable, l'impact négatif des pesticides sur l'environnement et les difficultés de leur utilisation liées au développement rapide de résistance sont des facteurs clés d'évolution de l'agriculture vers une moindre utilisation d'intrants chimiques. Environ 50 produits biologiques commerciaux sont homologués à travers le monde pour lutter contre les maladies cryptogamiques des plantes (www.agr.gc.ca). Des investissements scientifiques et industriels considérables sont à l'origine de la mise au point de ces produits. Compte tenu de ces investissements, une connaissance de leur durabilité constitue un élément clé à leur développement. Au niveau scientifique, malgré la grande quantité d'articles publiés sur la lutte biologique contre les maladies cryptogamiques, la diversité de sensibilité et le potentiel évolutif des bioagresseurs vis-à-vis des agents de protection biologique restent des domaines de connaissances très parcellaires. Pour les champignons, à notre connaissance, un seul

exemple d'une perte d'efficacité d'un agent de protection biologique a ainsi été décrit dans la littérature scientifique (Li et Leifert, 1994). Le risque principal induit par l'utilisation des agents de lutte biologique est de voir leur efficacité rapidement contournée par une sous-population devenue moins sensible ou résistante à l'agent de protection biologique utilisé.

Comme mentionné auparavant, les mécanismes par lesquels les micro-organismes contrôlent les agents pathogènes des plantes sont très divers. Au cours de ces travaux, nous nous sommes focalisés sur le champignon *B. cinerea* et sur la pyrrolnitrine, antibiotique produit par divers agents de protection biologique anti-*Botrytis*. Cet antibiotique présente une analogie de structure avec les fongicides de la famille des phenylpyrroles dont les mécanismes de résistance chez les champignons sont en partie connus. *Botrytis cinerea* constitue une menace économique récurrente sur de nombreuses cultures. Un manque ou des pertes d'efficacité des méthodes de lutte traditionnelles (lutte chimique essentiellement) sont régulièrement observés. La forte diversité et le potentiel de variabilité des populations de ce champignon peuvent avoir des répercussions sur l'efficacité et la durabilité des méthodes de protection, et en particulier la protection biologique.

5.2. Objectifs des travaux réalisés

Les objectifs de cette thèse s'inscrivent dans un projet global visant à évaluer les capacités de contournement de la protection biologique par des agents pathogènes. Plus spécifiquement, mon travail a consisté à estimer le potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des agents de protection biologique producteurs de pyrrolnitrine. Les questions que nous nous sommes posées au cours de ce travail sont les suivantes:

- Existe-t-il dans les populations naturelles de *B. cinerea*, des isolats avec une sensibilité réduite à la pyrrolnitrine?
- *Botrytis cinerea* est-il capable de devenir moins sensible à la pyrrolnitrine, et à des agents de protection biologique produisant cet antibiotique, lorsqu'il est soumis à une forte pression de sélection *in vitro* ?
- La résistance à la pyrrolnitrine est elle stable en absence de pression de sélection?
- Les souches moins sensibles à la pyrrolnitrine ont-elles un désavantage sélectif en absence de pression de sélection?
- Quels sont les mécanismes impliqués dans la résistance de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine?

Ce mémoire est constitué de 6 chapitres répartis comme suit:

Chapitre I - Etude bibliographique.

Chapitre II - Évaluation de la diversité de la sensibilité de *Botrytis cinerea* à la pyrrolnitrine

Pour tester l'hypothèse de la préexistence dans les populations naturelles de *B. cinerea* d'isolats avec une sensibilité réduite à la pyrrolnitrine, 204 isolats de *B. cinerea* échantillonnés entre 1987 et 2008 sur des hôtes différents et dans des localités différentes ont été testés pour leur niveau de sensibilité à la pyrrolnitrine. Un sous échantillon d'isolats ayant des niveaux de sensibilité variable à l'antibiotique a été prélevé pour tester l'efficacité *in vitro* et le niveau de protection sur tomate d'une bactérie productrice de pyrrolnitrine, *Pseudomonas chlororaphis*. Un lien éventuel entre le niveau de sensibilité à la pyrrolnitrine et la résistance à des fongicides ou le niveau d'agressivité sur tomate a été testé.

Chapitre III - Adaptation de *Botrytis cinerea* à la pyrrolnitrine, et coûts adaptatifs associés à la résistance

Pour évaluer l'adaptation possible de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine, 20 générations successives de 5 isolats différents ont été produites *in vitro* sur un milieu gélosé en présence de l'antibiotique. Une comparaison pour le niveau de résistance à la pyrrolnitrine, des générations obtenues sous pression de sélection, avec celles obtenues en absence de pression de sélection, et avec la souche sauvage, ont été faites. La stabilité de la 'résistance' a été étudiée en faisant des générations *in vitro* en absence de pyrrolnitrine. Enfin, la 'fitness' des générations résistantes a été estimée par des tests mesurant la croissance mycélienne, la sporulation et l'agressivité sur tomate et pomme.

Chapitre IV - Comparaison histologique du développement sur la tomate, d'un mutant résistant à la pyrrolnitrine et de la souche sauvage sensible

Le but de cette partie était d'appréhender les causes de la perte d'agressivité sur la tomate d'une souche de *B. cinerea* ayant acquis la résistance à la pyrrolnitrine. A cette fin, nous avons réalisé une comparaison histologique dans les tissus de tomate, du développement d'un variant résistant à la pyrrolnitrine et de sa souche sauvage sensible, sur 5 jours consécutifs,

Chapitre V - Comparaison du déterminisme génétique de la résistance de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine et à l'iprodione

Les mécanismes de résistance à la pyrrolnitrine ont été explorés en comparant la résistance à la pyrrolnitrine avec la résistance à des fongicides anti-*Botrytis* présentant des similitudes de mode d'action et/ou de structure avec cet antibiotique (dicarboximides, phénylpyrroles). A cette fin, 20 générations successives de 5 isolats différents ont été produites *in vitro* sur un milieu gélosé en présence du fongicide iprodione (dicarboximide). Une comparaison phénotypique des générations obtenues sous pression de sélection pyrrolnitrine, avec celles obtenues en présence d'iprodione et avec la souche sauvage, ont été faites pour leur niveau de résistance au fongicide et à l'antibiotique. La caractérisation des mécanismes moléculaires associés à la résistance à la pyrrolnitrine a été réalisée à partir des connaissances des mécanismes de résistance de *B. cinerea* à l'iprodione (modifications dans le gène *bos1* codant pour l'histidine-kinase). Le gène *bos1* a été séquencé et comparé entre générations résistantes et sensibles à la pyrrolnitrine et au fongicide.

Chapitre VI - Stabilité des marqueurs microsatellites chez *Botrytis cinerea* après exposition à différentes pressions de sélection

Ce dernier chapitre aborde la stabilité des marqueurs microsatellites chez différentes souches de *B. cinerea* après exposition à différentes pressions de sélection (pyrrolnitrine, iprodione, PDA et un milieu pauvre en nutriment). Des variations phénotypiques liées à des mutations ont été mises en évidence chez *B. cinerea* (voir chapitre III et V), et des mutations éventuelles sur les marqueurs microsatellites ont été recherchées.

Chapitre II

Evaluation de la diversité de la sensibilité de *Botrytis cinerea* à la pyrrolnitrine, antibiotique produit par divers agents de lutte biologique.

Publication 1

Assessing the diversity of sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological control agents.

S. Ajouz, A. S. Walker, F. Fabre, P. Leroux, P. C. Nicot and M. Bardin

(à soumettre à BioControl)

Assessing the diversity of sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological control agents.

S. Ajouz¹, A.S. Walker², F. Fabre¹, P. Leroux², P. C. Nicot¹ and M. Bardin^{1*}

¹ INRA, UR407, Plant Pathology Unit, Domaine St Maurice, F-84140 Montfavet, France

² INRA UMR 1290, Bioger-CPP, Route de St Cyr, F-78026 Versailles cedex, France.

* Corresponding author. Mailing address: INRA, UR407, Unité de Pathologie Végétale, Domaine St Maurice, F-84140 Montfavet, France. Phone: 33-432-72-28-55. Fax: 33-432-72-28-41. E-mail: marc.bardin@avignon.inra.fr

Short title: Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyrrolnitrin

Abstract

To assess the diversity of the fungal plant pathogen *Botrytis cinerea* to the biological control agents producing the antibiotic pyrrolnitrin, 204 isolates collected from different crops were tested for sensitivity to pyrrolnitrin using a spore germination assay. The baseline distribution of the effective concentration reducing 50% of the spore germination compared to the control (EC₅₀) was determined. Isolates of *B. cinerea* exhibited an important range of sensitivity to pyrrolnitrin with an 8.4-fold difference in EC₅₀ values between the most sensitive and the least sensitive isolates. The pyrrolnitrin EC₅₀ values of these isolates did not reveal a normal distribution and different sub-populations are suggested. Results obtained with the model-based clustering analysis indicate that the distribution of the EC₅₀ values best fit a normal mixture model with 3 components and unequal variance. No correlation was observed between the level of sensitivity to pyrrolnitrin and the aggressiveness of isolates on tomato plants. The less sensitive isolates were resistant to several fungicides suggesting that multidrug resistant isolates are also resistant to pyrrolnitrin. The efficacy of the pyrrolnitrin-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PhZ24 was tested on tomato plants and *in vitro* on Petri plates with isolates of *B. cinerea* having different level of sensitivity to pyrrolnitrin. The results showed that whatever the EC₅₀ value of the isolates tested, no significant differences in sensitivity were observed towards this bacterium suggesting an absence of resistance to this biological control agent within *B. cinerea* isolates.

Keywords: durability, distribution, aggressiveness, multidrug resistance, fungicide

Introduction

Gray mould, caused by the fungus *Botrytis cinerea* Pers.:Fr (teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), is a severe disease on a wide range of crops with economic importance (Jarvis, 1980). Chemical control remains the main measure to reduce the incidence of this pathogen in most crops but resistance of *B. cinerea* to most fungicides has been reported worldwide (Leroux, 2004). The development of biological control methods may be a good complement to control the disease and many biological control agents have been described in the past years (Elad and Stewart, 2004; Elmer and Reglinski, 2006). Mechanisms involved in the biological control include hyperparasitism, induction of plant-host resistance, competition for nutrients or production of inhibitory metabolites (Elad and Stewart, 2004). Several bacteria, such as *Enterobacter agglomerans*, *Serratia* spp. or *Pseudomonas* spp., described as potential biological control agents against *B. cinerea* produce the antibiotic pyrrolnitrin (3-chloro-4-(2' -nitro-3' -chlorophenyl)-pyrrole) (Chernin et al., 1996; Janisiewicz and Roitman, 1988; Raaijmakers et al., 2002). This antibiotic has been reported to inhibit the growth of *B. cinerea* (Hammer et al., 1993). A recurring problem encountered in the field with biological control against plant pathogens is the inconsistency of its efficacy (Elad and Stewart, 2004). This fact is generally attributed to variable climatic conditions encountered in the field, the lack of ecological competence of the biological control agent, and/or an unstable quality of the products (Elad and Stewart, 2004). However, possible reduction of efficacy of biological control may also be related to the variability of sensitivity of plant pathogens to biological control agents.

The build-up of field resistance to biological control agents could arise if plant pathogens have the ability to produce natural mutants with reduced susceptibility under the selection pressure of products used by farmers. For instance, Li and Leifert (1994) have shown that after 10 successive treatments on plants with the antibiotic-producing bacterium *Bacillus subtilis*, its efficacy against *B. cinerea* dropped dramatically. In a recent study, Ajouz et al. (2010) have demonstrated that *B. cinerea* can become less sensitive to the pyrrolnitrin, antibiotic produced by several biocontrol agents. This resistance to pyrrolnitrin made the pathogen less sensitive to a pyrrolnitrin-producing bacterium in *in vitro* tests (Ajouz et al., 2010). Possible loss of efficacy of a biological control agent could also result from the selection of pre-existing plant pathogen isolates with low susceptibility in natural populations. Schouten et al. (2004) have, for example, observed that 17% of the strains of *Fusarium oxysporum* were naturally tolerant to the antibiotic 2,4 diacetylphloroglucinol (2,4 DAPG). A recent study has shown that *B. cinerea* can tolerate the antibiotic 2,4 DAPG produced by the bacteria *Pseudomonas* spp. (Schouten et al.,

2008). Considering this, one might fear a possible repercussion on the durability of efficacy of biological control agents that produce antibiotics, despite the commonly reported assumption that resistance of plant pathogens to biological control agents will develop less frequently as compared to chemical control methods (Duffy et al., 2003). Knowledge on the potential development of resistance to biological control agents can thus help to devise or improve resistance management strategies.

In this study, efforts have been focused on the antibiotic pyrrolnitrin produced by several biological control agents. The main purposes of this work were (i) to establish a baseline sensitivity distribution to pyrrolnitrin in order to monitor future shifts in sensitivity to this antibiotic in *B. cinerea* populations and (ii) to assess the possible risk of resistance to a pyrrolnitrin-producing biological control bacterium. Additional objectives were to investigate if the resistance to pyrrolnitrin within *B. cinerea* isolates has an effect on their level of aggressiveness on tomato and if a cross-resistance between pyrrolnitrin and other fungicides is detected.

Materials and methods

Collection and maintenance of *Botrytis cinerea* isolates

Two hundred and four isolates of *B. cinerea* were used in this study. These isolates have a wide diversity regarding year and region of isolation, plant hosts or substrate. All these isolates were collected from 1987 to 2008 with a majority acquired after 2000 (125 isolates). Most isolates were sampled from France (192), of which 168 were from the southern and 24 from the northern part of the country. In addition, 6 isolates came from Italy, 5 from Syria and one from Portugal. Most isolates were collected from different plant species: 81 from tomato, 56 from grape, 5 from rose, 4 from cucumber, 3 from strawberry, and one isolate from each of the following plant species, artichoke, pepper, carrot, onion, asparagus, peach fruit, cherry fruit, kiwifruit, basil, hydrangea, gerbera, primrose, cyclamen and poinsettia. Forty one isolates were not sampled from diseased plants; they were collected from the air (28 isolates), bird feathers (7), rainwater (3), snow (2) and plant debris (1). All these isolates were single-spored and maintained in stock cultures stored at -20°C in a phosphate buffer 0.06 M containing 20% (V/V) of glycerol.

Inoculum production

Inoculum of *B. cinerea* was produced in Petri dishes on Potato Dextrose Agar medium (PDA 39 g l⁻¹; Difco Laboratory, Detroit, Michigan) incubated under cool white fluorescent light (14-hour photoperiod – 65 μmole m⁻² s⁻¹) in a growth chamber at 21°C (14h day and 10h night). Spores were collected in 5 ml of water on 14-day-old cultures. The spore suspensions were vortexed with glass beads (2.5 mm diameter) to separate the spores and then filtered through 30 μm mesh filters to remove mycelial fragments. The final concentration of the suspensions was adjusted to 10⁶ spores ml⁻¹ with the aid of a hemacytometer.

Effect of pyrrolnitrin on spore germination of *Botrytis cinerea*

The effect of pyrrolnitrin (purified microbial pyrrolnitrin >95 %, Sigma chemical, Israel) was tested on spore germination. A stock solution was prepared by dissolving the antibiotic in methanol at a concentration of 1 mg ml⁻¹ and stored at 4°C in the dark to preserve its activity. Pyrrolnitrin was added at different concentrations from 0 to 500 μg l⁻¹ to Glucose Agar medium (GA) containing 10 g l⁻¹ glucose and 12.5 g l⁻¹ agar. The spore germination rate was estimated 24 hours after inoculation for each isolate by evaluating 100 arbitrarily-selected spores per plate in each of three plates. A spore was considered as germinated if its germ tube was at least as long as its length. The whole experiment was carried out three times independently.

The 50% effective concentration (EC₅₀) was estimated as described by Leroux et al. (1999), using the regression curves obtained by graphically plotting the germination rate at 24 hours after inoculation (nontransformed) against the log-transformed values of the antibiotic concentrations. To test the effect of the origin of the *B. cinerea* isolates on their sensitivity to pyrrolnitrin, the isolates collected from different substrates (tomato, grape, other host plants and other substrates) were grouped and differences of mean ranks for each group of isolates were determined using the Kruskal-Wallis nonparametric test with Statistica software. A resistance factor (RF) was calculated as the ratio of the EC₅₀ value of a given isolate (mean for the three independent repetitions of the test) over the EC₅₀ value of the most sensitive isolate (mean for the three independent repetitions of the test). For each isolate, the minimum inhibitory concentration was estimated as the concentration required for a total inhibition of the spore germination.

Baseline distribution of spore germination to pyrrolnitrin

To test the hypothesis that the distribution given by the 204 isolates of *B. cinerea* is a normal unimodal curve, we used the non parametric Shapiro-Wilk test with Statistica software.

To estimate the most probable model of distribution of the population of isolates, a model-based clustering analysis was realized. The distribution of the 204 EC₅₀ values estimated was analyzed using the package mclust of the R statistical software (<http://www.R-project.org>). The mclust package is a model-based clustering and discriminant analysis library (Fraley and Raftery, 2007). It models the data as arising from a Gaussian mixture model with several covariance structures. For our purpose in this study, two univariate Gaussian mixture models were considered. In the first one, the data are assumed to be distributed according to a mixture of *K* Gaussian with equal variance. In the second model, the variances are assumed to vary among the *K* components. To decide which covariance structure and which number of mixture components (*K*) best fit the data, the Bayesian Information Criterion (BIC) was used.

Effect of pyrrolnitrin on mycelium growth and on spore production of *Botrytis cinerea*

The activity of pyrrolnitrin was tested on germ tube elongation, mycelium growth and spore production for 8 isolates of *B. cinerea* with EC₅₀ values for spore germination varying from the most sensitive to the less sensitive. Pyrrolnitrin was added at the same concentrations as described above, to GA medium to estimate germ tube elongation and to PDA medium to measure mycelium growth and spore production. Germ-tube length (µm) was measured with the help of a microscope 48 hours after inoculation, using an image analyzing software (Visiolab1000, BIOCOM S.A, Paris, France). The average germ-tube elongation was determined by measuring 20 to 30 germ tubes from arbitrarily-selected germinated spores for each of three independent replicates of the test. The mycelium growth was assessed by placing in the center of a 55-mm Petri plate a 5-mm mycelium plug taken from the periphery of a 4-day-old colony. The inoculated plates were incubated at 21°C in the dark and colony diameter was measured 3 days after inoculation. Spore production was determined 14 days after inoculation on the same plates. Spores were scrapped from the media, suspended in water and spore concentration was determined using a hemacytometer. Three plates were inoculated for each isolate and the whole experiment was repeated three times. For each isolate, values of EC₅₀ were estimated for germ tube elongation and for mycelial growth with the same method as described above for the germination test.

To test the hypothesis that the EC₅₀ values calculated on the basis of the germ-tube elongation, the mycelial growth and the sporulation were identical between the different isolates of *B. cinerea*, a one-way analysis of variance was performed using the ANOVA module of Statistica software. The multiple comparison test of Student-Newman-Keuls was used to compare the means. The relationships between EC₅₀ values obtained with spore germination and EC₅₀ values obtained with germ-tube elongation, mycelial growth and sporulation were assessed by computing the non-parametric Spearman rank coefficient using Statistica software.

Determination of sensitivity of *Botrytis cinerea* to different fungicides

To determine a possible cross-resistance between pyrrolnitrin and chemical fungicides, eight isolates of *B. cinerea*, chosen for their various levels of sensitivity to pyrrolnitrin, were tested. Sensitivity to 14 fungicides (belonging to 11 different fungicide families) was realized as described by Leroux et al. (1999). We used, for each fungicide, the discriminatory inhibition concentrations (Chapeland et al., 1999; Leroux et al., 1999), in order to determine whether or not an isolate was resistant to a fungicide. For a given isolate, the resistance to the different fungicides was tested using a spore germination test at 21°C. The experiments were all repeated three times independently per isolate, each with three replicate plates. The relationship between sensitivity of isolates to pyrrolnitrin and to fungicides was examined by comparing the EC₅₀ for pyrrolnitrin to the number of fungicides to which isolates were resistant. The statistical analysis was carried out by computing the non-parametric Spearman rank coefficient using Statistica software.

In vitro interaction between *Botrytis cinerea* and the pyrrolnitrin-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PhZ24

The antagonistic activity of a pyrrolnitrin-producing bacterium was tested *in vitro* against fourteen isolates of *B. cinerea* having different EC₅₀ values varying from the most sensitive to the less sensitive ones. We used strain PhZ24 of *Pseudomonas chlororaphis* (Mazurier et al., 2009), which was kindly provided by P. Lemanceau (INRA Dijon, France). Confrontation tests were conducted on TSA medium (3 g l⁻¹ Tryptic Soy broth and 15 g l⁻¹ Agar) in 90 mm-diameter Petri plates as described by Ajouz et al. (2010). In each plate, the fungus (5 mm diameter mycelial plug) and the bacterium (20 µl droplet dosed at 10⁷ CFU per ml) were placed 25 mm apart. In control plates, a droplet of sterile distilled water was used instead of the

bacterial suspension. Three replicate plates were inoculated for each test and incubated at 21°C in the dark. The whole experiment was conducted three times independently. For each test, the width of the inhibition zone was measured daily for five days after inoculation. Additionally, mycelial growth (radius in mm) was measured and the inhibition of mycelial growth was assessed with an index computed as $[1 - (\text{radius of mycelial growth on control plates} / \text{radius of mycelial growth in presence of the bacterium})] \times 100$.

The levels of sensitivity of the 14 *B. cinerea* isolates to the bacterium *P. chlororaphis* were compared using the ANOVA module of Statistica software. In this analysis, the elementary replicate for a given isolate was the average width of the inhibition zone for the three replica plates used in each of the three independent repetitions.

Aggressiveness of *Botrytis cinerea* isolates and efficacy of biocontrol by *Pseudomonas chlororaphis* PhZ24 on tomato plants

The level of aggressiveness and the efficacy of *Pseudomonas chlororaphis* PhZ24 to control the fungal pathogen were tested with isolates of *B. cinerea* having various level of sensitivity to pyrrolnitrin. Aggressiveness was estimated for 14 isolates of *B. cinerea* and protection of tomato with the bacterium was tested for 7 isolates. The tests were done on 2-month old tomato plants cv. Monalbo (INRA, Avignon, France) as previously described (Bardin et al., 2008; Decognet et al., 2009). To this end, three leaves per plant were removed leaving 5-10 mm petiole stubs on the stems and each pruning wound was inoculated with 10 µl of a spore suspension of *B. cinerea* dosed at 10^6 spores per ml. The pathogen was inoculated alone as a control and to measure its aggressiveness. It was inoculated together with *P. chlororaphis* PhZ24 to test the efficacy of the pyrrolnitrin-producing bacterium against *B. cinerea*. The bacterium was applied to pruning wounds as 10 µl aliquots of a cell suspension dosed at 10^8 CFU ml⁻¹, 5 minutes after the inoculation of *B. cinerea*. The lengths of resulting stem lesions were monitored daily for 7 days after inoculation. All plants were incubated in a growth chamber with a photoperiod of 14 hours and maintained at 21°C with a relative humidity above 80%. The experiment was repeated three times independently, each with three replicate plants per treatment. To take into account the kinetics of disease development, we computed an average AUDPC for each isolate as described previously (Decognet et al., 2009). To facilitate the comparison of aggressiveness among isolates, a relative aggressiveness index (in percent) was computed as the ratio between the average AUDPC of the tested isolate and that of reference isolate BC1, multiplied by 100. The AUDPC values were used to calculate a

protection index as: $[100 \times (\text{AUDPC}_{\text{control}} - \text{AUDPC}_{\text{bacterial treatment}} / \text{AUDPC}_{\text{control}})]$, where $\text{AUDPC}_{\text{control}}$ represented the plants inoculated with *B. cinerea* alone and $\text{AUDPC}_{\text{bacterial treatment}}$, the plants inoculated together with *B. cinerea* and *P. chlororaphis* PhZ24.

The levels of sensitivity of *B. cinerea* isolates to *P. chlororaphis* between isolates were compared using the ANOVA module of Statistica software. In this analysis, the elementary replicate for a given isolate was the average protection index for the three replica plants used in each of the three independent repetitions. To test the hypothesis that the level of aggressiveness of an isolate was independent from its level of resistance to pyrrolnitrin, statistical analyses were performed using the ANOVA module of Statistica software, and the multiple comparison test of Student-Newman-Keuls was used to compare the means of the aggressiveness index values. The relationship between sensitivity to pyrrolnitrin and aggressiveness on tomato plants was assessed by computing the non-parametric Spearman rank coefficient using Statistica software.

Results

Effect of pyrrolnitrin on spore germination of *B. cinerea*

Two hundred and four field-collected *B. cinerea* isolates were tested for their sensitivity to pyrrolnitrin. The EC_{50} values based on spore germination rate ranged from 3.8 to 31.8 $\mu\text{g l}^{-1}$ and most isolates (52%) had an EC_{50} below 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Fig. 1). Significant differences in sensitivity to pyrrolnitrin were detected between isolates (ANOVA, $P < 0.001$). The least sensitive isolate was separated from the most sensitive isolate by a resistance factor of 8.4. None of the 204 isolates were able to germinate on medium amended with 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ pyrrolnitrin. No significant differences of mean sensitivity to pyrrolnitrin (based on mean EC_{50} values) were observed between different groups of isolates of *B. cinerea* coming from the different hosts, tomato, grape, other plants and non plant (ANOVA, $P = 0.84$) (Table 1). The Kruskal-Wallis nonparametric test indicates that the medians are not significantly different ($P = 0.08$).

The pyrrolnitrin EC_{50} values of these isolates were not normally distributed (non parametric Shapiro-Wilk test, $P < 0.0001$; Fig. 1). The distribution suggested the presence of different sub-populations. Model-based clustering analysis indicated that the distribution of the EC_{50} values

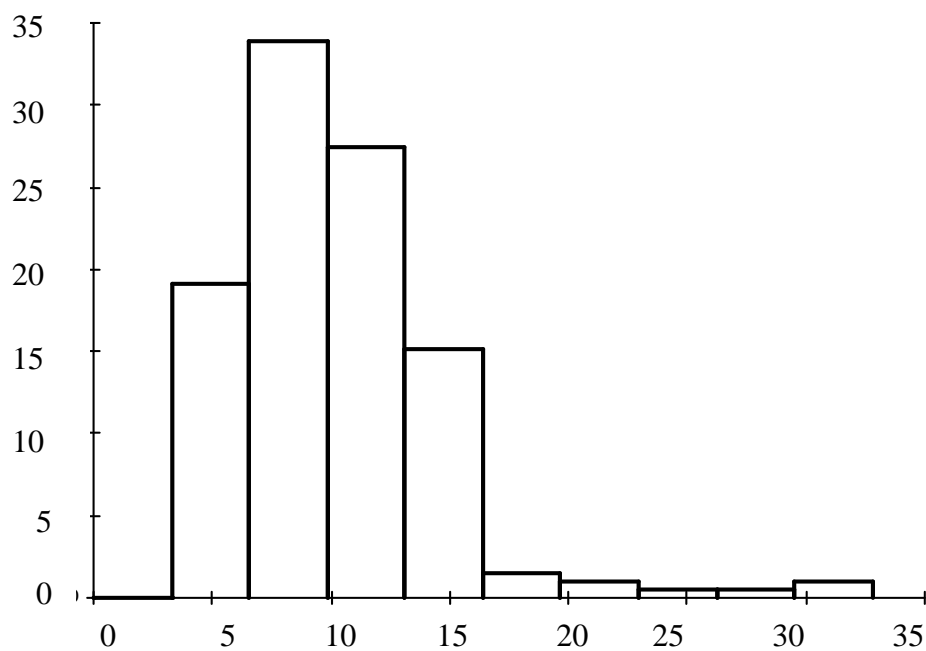


Fig. 1 Baseline sensitivity to the antibiotic pyrrolnitrin of 204 isolates of *Botrytis cinerea* collected from 1987 to 2008, based on inhibition of spore germination. The EC₅₀ is the effective concentration of pyrrolnitrin, in µg l⁻¹, inhibiting 50% of the spore germination

Table 1 Sensitivity to pyrrolnitrin of 204 *Botrytis cinerea* isolates sampled from different host plants and substrates between 1987 and 2008, based on inhibition of spore germination

		No. of isolates	EC ₅₀ (µg l ⁻¹) ^b			RF ^c	
			Mean ^a	Median	Minimum		Maximum
Whole population of isolates		204	10.2 ± 0.3	9.5	3.8	31.8	8.4
Host	Tomato	81	9.9 ± 0.3	10.0	3.8	16.0	4.2
	Grape	56	10.4 ± 0.9	7.5	4.3	31.8	7.4
	Other host plants	26	10.6 ± 0.6	11.4	5.1	15.0	2.9
	Other substrates	41	10.4 ± 0.5	9.5	6.1	17.0	2.8

^a Mean ± standard error of the mean for each group of isolates

^b Values of EC₅₀ were estimated based on the spore germination rate.

^c RF = Resistance factor computed as the ratio EC₅₀ of the least sensitive isolate of the considered group of isolates / EC₅₀ of the most sensitive isolate of the considered group of isolates.

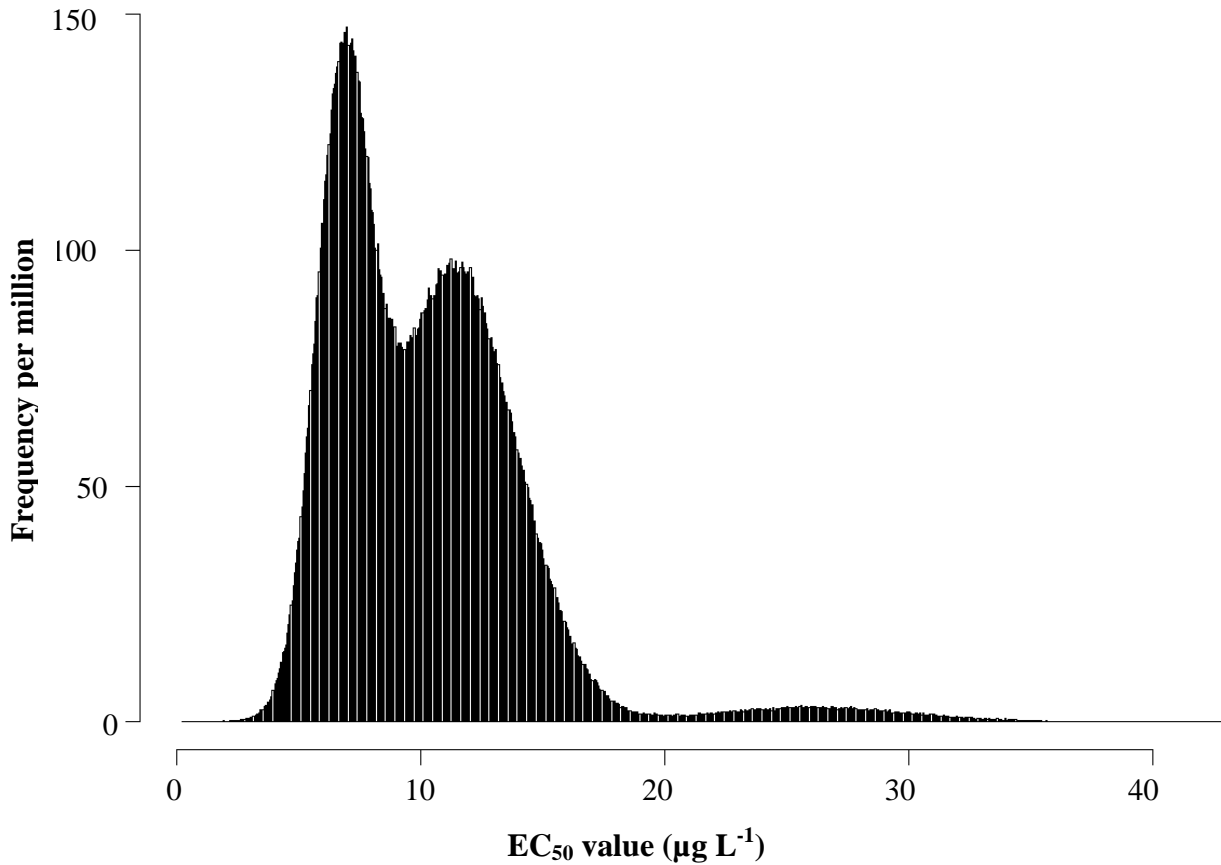


Fig. 2 Estimated distribution of the EC₅₀ values for the 204 isolates of *B. cinerea* using the package mclust of the R statistical software. Three components with unequal variance were identified. The first component regroup 35% of the isolates with a mean EC₅₀ of 6 µg l⁻¹ ($\sigma = 1.1$), the second one 62% of the isolates with a mean EC₅₀ of 11 µg l⁻¹ ($\sigma = 2.6$) and the last one only 3% of the isolates with a mean EC₅₀ of 26 µg l⁻¹ ($\sigma = 4$)

best fit a normal mixture model with 3 components and unequal variances (Fig. 2). The first component regrouped 35% of the isolates with a mean EC_{50} of $6 \mu\text{g l}^{-1}$ and a standard deviation σ of 1.1, the second one regrouped 62% of the isolates with a mean EC_{50} of $11 \mu\text{g l}^{-1}$ ($\sigma = 2.6$) and the last component regrouped only 3% of the isolates with a mean EC_{50} of $26 \mu\text{g l}^{-1}$ ($\sigma = 4$). Minimum inhibitory concentrations were defined for each isolate tested in this study. These concentrations were similar, ca. $20\text{-}30 \mu\text{g l}^{-1}$, between to the first two components of the population, which could be qualified as sensitive. The minimum inhibitory concentration was higher for the third component of the population, ca. $50\text{-}100 \mu\text{g l}^{-1}$. Based on these results, discriminatory doses of pyrrolnitrin can be defined as ca. $30 \mu\text{g l}^{-1}$ to differentiate sensitive from moderate resistant isolates and $100 \mu\text{g l}^{-1}$ to determine the highly resistant isolates.

Effect of pyrrolnitrin on mycelial growth and on spore production of *B. cinerea*

To test the effect of pyrrolnitrin on germ-tube elongation, mycelial growth and spore production, the *in vitro* inhibitory action of pyrrolnitrin was tested on 8 isolates of *B. cinerea* having various level of sensitivity to pyrrolnitrin based on spore germination tests. Significant differences between the 8 isolates tested were observed for the germ tube elongation, the mycelium growth and the sporulation (ANOVA, $P = 0.002$, $P = 0.005$ and $P < 0.001$, respectively, Table 2). Moreover, a significant correlation was observed between EC_{50} values obtained for spore germination and EC_{50} values obtained for spore production ($R_{\text{spearman}} = 0.79$, $P = 0.02$). However, the correlation between EC_{50} values for germination and EC_{50} values for germ-tube elongation was not statistically significant ($R_{\text{spearman}} = 0.65$, $P = 0.08$), there was none with EC_{50} values for mycelial growth ($R_{\text{spearman}} = 0.15$, $P = 0.71$). Spore germination, germ-tube elongation, mycelial growth and sporulation of the 8 isolates were completely inhibited at $100 \mu\text{g l}^{-1}$.

Among the isolates tested, three were significantly less sensitive to this antibiotic and had an EC_{50} , based on spore germination, 4.4 to 6.2 times higher than the most sensitive isolate tested (Table 2). They had an EC_{50} , based on sporulation, 6 to 13.6 times higher than the most sensitive isolate tested (Table 2). Moreover, they were able to produce nearly 12.6 times more spores than the most sensitive isolate tested on $10 \mu\text{g l}^{-1}$ pyrrolnitrin.

Table 2 Effect of pyrrolnitrin on spore germination, germ-tube elongation, mycelial growth and sporulation of 8 isolates of *Botrytis cinerea*. Data are means of three independent repetitions \pm standard error of the mean

Isolate	EC_{50} ($\mu\text{g l}^{-1}$) ^a			
	Spore germination	Germ-tube elongation	Mycelial growth	Sporulation
05-A-590	31.8 \pm 2.3 a	6.2 \pm 0.2 a	5.7 \pm 1.3 ab	9.5 \pm 0.5 a
05-A-550	27.7 \pm 2.1 b	7.1 \pm 0.7 a	5.7 \pm 1.9 ab	4.2 \pm 0.7 b
05-A-587	22.6 \pm 0.3 c	6.2 \pm 0.6 a	4.4 \pm 0.3 ab	4.9 \pm 0.4 b
BC26	12.1 \pm 1.2 d	3.8 \pm 0.8 ab	5.6 \pm 0.8 ab	0.8 \pm 0.2 c
H6	10.2 \pm 1.2 de	3.6 \pm 1.3 ab	1.3 \pm 0.3 b	1.0 \pm 0.1 c
BC1	7.0 \pm 0.3 e	4.9 \pm 0.4 ab	5.1 \pm 0.1 ab	0.7 \pm 0.1 c
BC25	5.9 \pm 0.9 e	2.3 \pm 0.3 b	4.2 \pm 1.4 ab	2.3 \pm 0.9 c
BC21	5.1 \pm 0.2 e	5.9 \pm 1.0 a	7.2 \pm 0.6 a	0.7 \pm 0.2 c
<i>P</i> value ^b	< 0.001	= 0.002	= 0.005	< 0.001
Mean \pm SEM ^c	14.2 \pm 1.2	4.8 \pm 0.3	4.9 \pm 0.5	2.8 \pm 0.6

^a For each isolate, means within a column followed by the same letter are not significantly different (ANOVA, $\alpha = 0.05$; Newman-Keuls test).

^b *P* value associated to a one-way analysis of variance (ANOVA).

^c average values for the 8 isolates \pm standard error of the mean

Protection of tomato against *B. cinerea* with the pyrrolnitrin-producing *P. chlororaphis* PhZ24 strain

Seven isolates of *B. cinerea* having various levels of sensitivity to pyrrolnitrin were tested on tomato plants to estimate the efficacy of the pyrrolnitrin-producing *P. chlororaphis* PhZ24 strain on tomato plants. The efficacy of protection of tomato by the bacterium was high as the protection indices were comprised between 97.1 % and 100% (Table 3). The protection indices were not significantly different between the 7 isolates whatever their EC₅₀ values (ANOVA, $P = 0.25$, Table 3). The average protection index for the 7 isolates tested was $98.8 \pm 0.4\%$.

In vitro sensitivity of *B. cinerea* mycelial growth to the pyrrolnitrin-producing *P. chlororaphis* PhZ24 strain

The inhibitory activity of the pyrrolnitrin-producing bacterial strain *P. chlororaphis* PhZ24 was tested on mycelial growth *in vitro* on 14 isolates of *B. cinerea* differing in their level of sensitivity to pyrrolnitrin for spore germination. All isolates displayed a similar level of sensitivity to the bacterium, measured by the inhibition zone, whatever their EC₅₀ values for spore germination (ANOVA, $P = 0.47$, Table 3). The mean inhibition zone between the bacteria and the pathogen was 16.8 ± 0.4 mm for all the *B. cinerea* isolates tested (Fig. 3). The bacterium reduced the radial mycelial growth of the pathogen fungus with a mean growth inhibition of 71.5 ± 0.9 %.

Relationship between sensitivity to pyrrolnitrin and to fungicides

Eight isolates of *B. cinerea* differing in their EC₅₀ values for pyrrolnitrin inhibition of spore germination were tested for their sensitivity to 14 different anti-*botrytis* fungicides. Different patterns of sensitivity to fungicides were observed (Table 4). The three isolates least sensitive to pyrrolnitrin were resistant to 7 out of the 11 fungicide families tested (Table 4), suggesting that they are multidrug resistant isolates. However, these three isolates had different patterns of resistance to fungicides (Table 4). Among the five other isolates tested, three patterns of fungicide resistance were detected. Isolates BC1 and BC26 were both resistant to the same 5 fungicide families (Table 4). Isolates BC21, BC25 and H6 were resistant to 3 fungicide families only (Table 4). However, H6 was resistant to carbendazim while BC21 and BC25 were sensitive to this fungicide and resistant to diethofencarb (Table 4). Moreover, a significant

Table 3 Protection of tomato with the pyrrolnitrin-producing strain PhZ24 of *Pseudomonas chlororaphis*, *in vitro* sensitivity to PhZ24 and relative aggressiveness on tomato plant of isolates of *Botrytis cinerea* having different EC₅₀ values to pyrrolnitrine based on spore germination. Data are means of three independent repetitions ± standard error of the mean

Isolate	<i>In vitro</i> EC ₅₀ to pyrrolnitrin (µg l ⁻¹) ^a	<i>P. chlororaphis</i> PhZ24		Relative aggressiveness index (%) ^d
		Protection of tomato plant (%) ^b	<i>In vitro</i> inhibition zone (mm) ^c	
05-A-590	31.8 ± 2.3 a	100.0 ± 0.0	15.0 ± 1.2	33.7 ± 7.5 bcd
05-A-550	27.7 ± 2.1 a	100.0 ± 0.0	15.0 ± 1.2	28.7 ± 1.8 bcd
05-A-587	22.6 ± 0.3 b	100.0 ± 0.0	17.7 ± 0.7	29.0 ± 5.0 bcd
E319	14.3 ± 0.3 c	97.1 ± 1.3	19.3 ± 1.3	63.5 ± 5.8 b
E41	13.5 ± 5.0 cd	98.0 ± 1.4	17.5 ± 2.0	55.2 ± 8.5 b
BC26	12.1 ± 1.2 cde	- ^d	16.6 ± 1.7	10.4 ± 2.7 cd
BC50	12.0 ± 1.5 cde	100.0 ± 0.0	16.8 ± 2.2	32.6 ± 1.4 bcd
E14	11.5 ± 1.6 cde	-	17.1 ± 3.1	67.3 ± 14.3 b
H6	10.2 ± 1.2 cde	-	14.3 ± 1.9	0.0 ± 0.0 d
BC1	7.0 ± 0.3 de	98.0 ± 1.3	16.5 ± 0.4	100.0 ± 0.0 a
NH-PL3	6.4 ± 0.8 de	-	17.0 ± 1.7	119.9 ± 18.7 a
NH-OI4	6.2 ± 0.7 de	-	16.3 ± 3.0	47.1 ± 8.2 bc
BC25	5.9 ± 0.9 de	-	19.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0 d
BC21	5.1 ± 0.2 e	-	18.3 ± 1.1	53.2 ± 9.1 b
<i>P</i> value ^e	< 0.001	= 0.25	= 0.47	< 0.001

^a For each isolate, means within a column followed by the same letter are not significantly different (ANOVA, α = 0.05; Newman–Keuls test).

^b Protection of tomato plants by *P. chlororaphis* PhZ24 was calculated as follows [100x (AUDPC_{control} - AUDPC_{bacterial treatment}/AUDPC_{control})] where AUDPC_{control} corresponds to the plants inoculated with *B. cinerea* alone and AUDPC_{bacterial treatment}, the plants inoculated together with *P. chlororaphis* PhZ24.

^c Zone of inhibition measured in mm 5 days after inoculation.

^d Relative aggressiveness index = 100x (AUDPC_{isolate}/AUDPC_{BC1}) where AUDPC_{BC1} correspond to the plants inoculated with isolate BC1 and AUDPC_{isolate}, the plants inoculated with an other isolate. For each isolate, means within a column followed by the same letter are not significantly different (ANOVA, α = 0.05; Newman–Keuls test).

^d - = not done or not relevant

^e *P* value associated to a one-way analysis of variance (ANOVA).

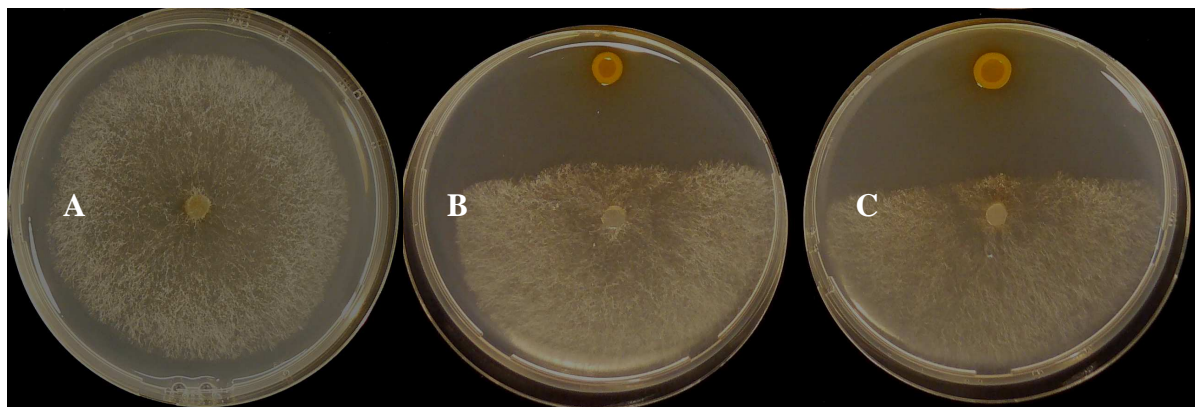


Fig. 3 Effect of pyrrolnitrin-producing strain PhZ24 of *Pseudomonas chlororaphis* on the mycelial development of *Botrytis cinerea* on TSA medium after 5 days of incubation. A is the control *B. cinerea* without *P. chlororaphis* PhZ24, B is the confrontation between the sensitive isolate BC1 of *B. cinerea* ($EC_{50} = 7.0 \mu\text{g l}^{-1}$) and *P. chlororaphis* PhZ24, C is the confrontation between the less sensitive isolate 05-A-590 of *B. cinerea* ($EC_{50} = 31.8 \mu\text{g l}^{-1}$) and *P. chlororaphis* PhZ24.

Table 4 Pattern of resistance of 8 *Botrytis cinerea* isolates having different EC₅₀ on pyrrolnitrin based on spore germination, to 14 fungicides belonging to 11 chemical families

Pyrrolnitrin ^a		05-A-590	05-A-550	05-A-587	BC26	H6	BC1	BC25	BC21	
EC ₅₀ (µg l ⁻¹)		31.8 a	27.7 b	22.6 c	12.1 d	10.2 de	7.0 e	5.9 e	5.1 e	
Fungicides ^b (chemical family)	Iprodione									
	Procymidone	(Dicarboximides)	R	R	R	R	S	R	S	S
	Vinclozolin									
	Fenpiclonil	(Phenylpyrroles)	R	R	S	S	S	S	S	S
	Fludioxonil									
	Dicloran	(Aromatic Hydrocarbons)	R	R	S	R	S	R	S	S
	Carbendazim	(Benzimidazoles)	S	S	S	S	R	S	S	S
	Diethofencarb	(N-phenylcarbamates)	R	R	R	R	S	R	R	R
	Pyrimethanil	(Anilinopyrimidines)	S	S	R	S	S	S	S	S
	Prochloraze	(Imidazoles)	S	S	R	S	S	S	S	S
	Fenhexamid	(Hydroxyanilides)	S	S	S	S	S	S	S	S
	Tolnaftate	(Thiocarbamates)	R	R	R	S	S	S	S	S
	Fenpropidine	(Piperidines)	R	R	R	R	R	R	R	R
	Cymoxanil	(Cyanooximes)	R	R	R	R	R	R	R	R

^a For each isolate, means within a line followed by the same letter are not significantly different (ANOVA, $\alpha = 0.05$; Newman-Keuls test).

^b Discriminatory concentrations allowing the classification of isolates in 2 categories, sensitive (S) and resistance (R), have been defined by Leroux et al. (1999), as follows: iprodione 2.5 µg ml⁻¹, procymidone 10 µg ml⁻¹, vinclozolin 5 µg ml⁻¹, fenpiclonil 0.5 µg ml⁻¹, fludioxonil 0.2 µg ml⁻¹, dicloran 25 µg ml⁻¹, carbendazim 1 µg ml⁻¹, diethofencarb 10 µg ml⁻¹, pyrimethanil 1 µg ml⁻¹, prochloraze 0.25 µg ml⁻¹, fenhexamid 0.4 µg ml⁻¹, tolafate 10 µg ml⁻¹, fenpropidine 0.08 µg ml⁻¹, cymoxanil 25 µg ml⁻¹.

correlation was observed between the level of sensitivity to pyrrolnitrin (EC_{50} values) and the number of fungicides to which the isolates were resistant ($R_{\text{spearman}} = 0.88$, $P = 0.004$).

Relationship between sensitivity to pyrrolnitrin and aggressiveness of isolates on tomato plants

To assess the relationship between the EC_{50} values to pyrrolnitrin and the level of aggressiveness on tomato plants, 14 isolates of *B. cinerea* having different EC_{50} values on pyrrolnitrin were tested. Infection of pruning wounds and development of stem lesions was observed for the 12 out of 14 isolates tested. Results of this test revealed significant differences in the level of aggressiveness on tomato plant of *B. cinerea* isolates (ANOVA, $P < 0.001$; Table 3). However, no evidence of correlation between EC_{50} values to pyrrolnitrin and index of aggressiveness on tomato was observed ($R_{\text{spearman}} = -0.14$, $P = 0.64$).

Discussion

Historically, much effort has been devoted to the study of the efficacy of the antibiotic pyrrolnitrin and of pyrrolnitrin-producing biological control agents to control *B. cinerea* on different plants or in post harvest conditions (Chernin et al., 1996; Janisiewicz et al., 1991; Janisiewicz and Roitman, 1988). In contrast, the study of sensitivity distribution to pyrrolnitrin of natural isolates of *B. cinerea* is scant or lacking. The evaluation of 204 isolates in the present study revealed that their spore germination was not equally affected by the antibiotic pyrrolnitrin. However, despite this diversity, a similarly high level of sensitivity to the pyrrolnitrin-producing bacterium *P. chlororaphis* PhZ24 was observed on tomato plants, for all isolates tested. A possible explanation for this phenomenon may be related to the concentration of pyrrolnitrin present in the vicinity of the bacterium in the medium. Although the quantity of pyrrolnitrin produced by strain PhZ24 of *P. chlororaphis* on tomato plant is not known, one may hypothesise that resulting concentrations could be greater than those used to determine the baseline sensitivity of *B. cinerea* to pyrrolnitrin *in vitro*. Another explanation could be that isolates of *B. cinerea* were probably not resistant to another antibiotic, the phenazine-1-carboxylic acid, possibly also produced by strain PhZ24 of *P. chlororaphis* (Mazurier et al., 2009; Schoonbeek et al., 2002). Anyway, these results suggest that the current population of *B. cinerea* may be effectively controlled by this pyrrolnitrin-producing biological control agent.

In this study, we observed that *B. cinerea* exhibited a large range of sensitivity to pyrrolnitrin, with 8.4-fold differences in EC_{50} values between the least and the most sensitive isolates. The

existence of this important range of sensitivity reflects the fact that *B. cinerea* populations consist of a mixture of phenotypes varying in their sensitivity to pyrrolnitrin. Six isolates were significantly less sensitive to this antibiotic, with a mean EC₅₀ of ca. 26 µg l⁻¹ and a minimum inhibitory concentration of ca. 50-100 µg l⁻¹, demonstrating that such levels of resistance are already present in the field. Supplementary evaluation done for 8 isolates revealed that the effect of pyrrolnitrin on spore production was significantly different between isolates. The three least sensitive isolates tested were able to produce nearly 13 times more spores than the other isolates on a PDA medium amended with a low dose of pyrrolnitrin (10 µg l⁻¹).

The six isolates that were significantly less sensitive to the antibiotic were all collected from fungicides-treated vineyard in Champagne and they were classified as multidrug resistance (MDR) isolates (Walker, unpublished data). This study leads to speculation whether MDR isolates would be systematically resistant to pyrrolnitrin. Work done by Schoonbeek et al. (2002) revealed that some broad-spectrum antibiotics produced by *Pseudomonas* spp. induced expression of several ATP-binding cassette (ABC) transporter genes in *B. cinerea*. These ABC transporters are involved in the multidrug resistance and affect the sensitivity of *B. cinerea* to fungicides and to various natural metabolites (De Waard, 1997; Schoonbeek et al., 2001). However, surprisingly, Schoonbeek et al. (2002) observed that treatment of *B. cinerea* with pyrrolnitrin did not induce expression of any of the ABC transporter genes tested, whereas fludioxonil, a fungicide derived from pyrrolnitrin, resulted in highly elevated expression levels of one ABC transporter gene (Schoonbeek et al., 2002). More work is needed to determine the exact relationship between the resistance to fungicides and to pyrrolnitrin and the role of ABC transporters in the resistance of *B. cinerea* to this specific antibiotic. This work would be of great interest to understand how *B. cinerea* acquired a resistance to pyrrolnitrin, while pyrrolnitrin-producing biological control agents were never used in the field in the regions of collection of the isolates tested in this study. One interesting issue would be to determine the possible effect of fungicide treatments on the development of resistance to this antibiotic. The occurrence of isolates with a resistance restricted to phenylpyrroles (similar to pyrrolnitrin in their chemical structure) or to dicarboximides or aromatic hydrocarbons, have been observed in the field (Leroux et al., 1999; Vignutelli et al., 2002), suggesting an absence of systematic cross-resistance between these fungicides in *B. cinerea*. However, in the case of laboratory-induced resistant mutants having higher level of resistance to these fungicides, cross-resistance between phenylpyrroles and dicarboximides has been extensively demonstrated in *B. cinerea* (Rosslénbroich and Stuebler, 2000; Ziogas et al., 2005) and other fungal species (Dry et al., 2004; Ziogas et al., 2005). Moreover, phenylpyrroles are also known to cross-resist with

pyrrolnitrin when the level of resistance is high (Okada et al., 2005). However, high levels of resistance of *B. cinerea* to fludioxonil, a phenylpyrrole fungicide, have been rarely found in the field (Baroffio et al., 2003; Vignutelli et al., 2002). The reduced fitness of the laboratory resistant-mutants has been suggested as a possible explanation for the scarcity of field isolates resistant to phenylpyrroles (Leroux et al., 1999; Vignutelli et al., 2002; Ziogas et al., 2005). Results obtained in this study showed that there was no significant correlation between the level of sensitivity to pyrrolnitrin and the aggressiveness on tomato plants for 14 isolates of *B. cinerea*, suggesting an absence of fitness cost for the isolates that are moderately resistant to pyrrolnitrin.

Another possible hypothesis to understand how *B. cinerea* acquired a resistance to pyrrolnitrin is related to the fact that *B. cinerea* is a saprobe and can survive in various environments, such as soil for instance (Jarvis, 1977). Pyrrolnitrin production is a widely distributed trait among different bacterial genera that are ubiquitous in soil and plant-associated environments (Garbeva et al., 2004; Raaijmakers et al., 2002). Therefore populations of *B. cinerea* may have occasional encounters with pyrrolnitrin-producing microorganisms and thus the possibility to develop resistance to this antibiotic.

Another interesting question arising from this study would be whether *B. cinerea* can acquire greater resistance to this antibiotic in the field. A study done with laboratory induced resistant isolates provides evidence that *B. cinerea* is able to gradually build-up resistance to high concentrations of pyrrolnitrin and subsequently to become less sensitive to a pyrrolnitrin-producing biological control agent *in vitro* (Ajouz et al., 2010). However this resistance is systematically associated with high fitness cost (Ajouz et al., 2010). But this last work was done with laboratory-induced mutants and the question of the possible adaptation of *B. cinerea* to pyrrolnitrin-producing antagonists merits further attention in the context of a commercial production. The establishment of baseline sensitivity to pyrrolnitrin and of discriminatory concentrations to this antibiotic may be helpful in future studies aiming at monitoring possible shifts in the sensitivity to pyrrolnitrin-producing biological control agents in *B. cinerea* populations.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Claire Troulet and Gisèle Riqueau for excellent technical assistance and Véronique Decognet and Christel Leyronas for providing isolates of *Botrytis*

cinerea. This work was supported by the French National Research Agency (ANR-ADD ECOSERRE project).

References

- Ajouz, S., et al., 2010. Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. Plant Pathology. in press.
- Bardin, M., et al., 2008. Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. Biological Control. 46, 476-483.
- Baroffio, C. A., et al., 2003. Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, and hydroxyanilide fungicides in Switzerland. Plant Disease. 87, 662-666.
- Chapeland, F., et al., 1999. Inheritance and Mechanisms of Resistance to Anilinopyrimidine Fungicides in *Botrytis Cinerea* (*Botryotinia Fuckeliana*). Pesticide Biochemistry and Physiology. 64, 85-100.
- Chernin, L., et al., 1996. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. Current Microbiology. 32, 208-212.
- De Waard, M. A., 1997. Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. Pesticide Science. 51, 271-275.
- Decognet, V., et al., 2009. Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. Phytopathology. 99, 185-193.
- Dry, I. B., et al., 2004. Dicarboximide resistance in field isolates of *Alternaria alternata* is mediated by a mutation in a two-component histidine kinase gene. Fungal Genetics and Biology. 41, 102-108.
- Duffy, B., et al., 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. Annual Review of Phytopathology. 41, 501-538.
- Elad, Y., Stewart, A., Microbial control of *Botrytis* spp. In: Y. Elad, et al., Eds.), *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 223-41.
- Elmer, P. A. G., Reglinski, T., 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. Plant Pathology. 55, 155-177.
- Fraley, C., Raftery, A. E., 2007. Model-based methods of classification: Using the mclust software in chemometrics. Journal of statistical software. 18, 13.

- Garbeva, P., et al., 2004. Quantitative detection and diversity of the pyrrolnitrin biosynthetic locus in soil under different treatments. *Soil Biology & Biochemistry*. 36, 1453-1463.
- Hammer, P. E., et al., 1993. Postharvest control of *Botrytis cinerea* on cut flowers with pyrrolnitrin. *Plant Disease*. 77, 283-286.
- Janisiewicz, W., et al., 1991. Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease*. 75.
- Janisiewicz, W. J., Roitman, J., 1988. Biological control of blue mold and grey mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*. 78, 1697-1700.
- Jarvis, R. W., 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology, and pathogenicity. A guide to the literature. Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.
- Jarvis, W. R., Epidemiology. In: J. R. Coley-Smith, et al., Eds.), *The biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK, 1980, pp. 219-250.
- Leroux, P., Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Y. Elad, et al., Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Press, The Netherlands, 2004, pp. 195-222.
- Leroux, P., et al., 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*. 18, 687-697.
- Li, H., Leifert, C., 1994. Development of resistance in *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Whetzel against the biological control agent *Bacillus subtilis* CL27. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 101, 414-418.
- Mazurier, S., et al., 2009. Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. *The ISME Journal*. 3, 977-991.
- Okada, A., et al., 2005. Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa*. *Journal of Pesticide Science*. 30, 378-383.
- Raaijmakers, J. M., et al., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81, 537-547.
- Rosslénbroich, H. J., Stuebler, D., 2000. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*. 19, 557-561.
- Schoonbeek, H., et al., 2001. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14, 562-571.

- Schoonbeek, H., et al., 2002. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15, 1165-1172.
- Schouten, A., et al., 2004. Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17, 1201-1211.
- Schouten, A., et al., 2008. Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology*. 10, 1145-1157.
- Vignutelli, A., et al., 2002. Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research*. 106, 329-335.
- Ziogas, B. N., et al., 2005. Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *European Journal of Plant Pathology*. 113, 83-100.

Chapitre III

Adaptation de *Botrytis cinerea* à la pyrrolnitrine et coûts associés à cette adaptation.

Publication 2

Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance.

S. Ajouz, P. C. Nicot and M. Bardin

(Plant Pathology. Sous presse)

Short title: *Durability of efficacy of biological control*

Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance

S. Ajouz P. C. Nicot and M. Bardin*

INRA, UR407, Plant Pathology Unit, Domaine St Maurice, F-84140 Montfavet, France

* Corresponding author. Mailing address: INRA, UR407, Unité de Pathologie Végétale, Domaine St Maurice, F-84140 Montfavet, France. Phone: 33-432-72-28-55. Fax: 33-432-72-28-41. E-mail: marc.bardin@avignon.inra.fr

Abstract

Many biocontrol agents have been described for the control of *Botrytis cinerea*, but to date, scientific knowledge is scarce regarding the durability of their efficacy. The objective of our work was to estimate the risk of a decrease in the efficacy of biocontrol due to selection pressure exerted by biocontrol agents on *B. cinerea*. In this study, efforts have been focused on pyrrolnitrin, an antibiotic identified in diverse biocontrol agents having an effect on *B. cinerea*. To evaluate a possible decrease in sensitivity to pyrrolnitrin, ten successive generations of 5 isolates of *B. cinerea* were produced *in vitro* in the presence of a sub-lethal dose of the antibiotic ($10\mu\text{g L}^{-1}$). For one isolate, a significant reduction in the sensitivity to pyrrolnitrin at the fifth generation was observed with a resistance factor (RF) of ca. 11. The production of 10 additional generations for 4 of these isolates, with increasing doses of pyrrolnitrin (from 100 to $4000\mu\text{g L}^{-1}$), resulted in the development of variants of *B. cinerea* with high levels of resistance to the antibiotic (RF > 1000) and a reduced sensitivity *in vitro* to a pyrrolnitrin-producing bacterium (mean growth inhibition of $24 \pm 7\%$ for the pyrrolnitrin-resistant generations vs. $70 \pm 3\%$ for the sensitive parent isolates). Reverse adaptation of resistant variants after 10 additional generations in absence of selection pressure was not observed suggesting a stability of the resistance. Comparison of the pyrrolnitrin-resistant generations and their sensitive parent isolates for mycelial growth, sporulation and aggressiveness on plant tissues reveals that the high level of resistance to the pyrrolnitrin has resulted in a high fitness cost. Reduction in mycelial growth was about 1.7 to 3.6 times and reduction in sporulation was about 3.8 to 6.6 times. Aggressiveness was between 7 and 11 times lower on tomato and 3 to 10 times lower on apple. This study provides evidence that a fungal plant pathogen is able to gradually build-up resistance to an antibiotic produced by a biocontrol agent.

Keywords: biological control, resistance, durability, selection, experimental evolution, fitness

Introduction

Botrytis cinerea Pers.:Fr (teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) is the causal agent of grey mould, an economically important disease that generates losses on a wide range of crops (Jarvis, 1980). The control of this disease relies mainly on the use of fungicides but the development of resistance of *B. cinerea* populations to the different families of fungicides complicates their use and threatens their effectiveness (Leroux, 2004). Biological control could be a good alternative or complement and many biological control agents against *B. cinerea* have been described in the past years (Elad & Stewart, 2004, Elmer & Reglinski, 2006). The known modes of action include hyperparasitism, induction of plant-host resistance, competition for nutrients and the production of inhibitory metabolites (Elad & Stewart, 2004). The antibiotic pyrrolnitrin (3-chloro-4-(2' -nitro-3' -chlorophenyl)-pyrrole) is produced by various bacteria such as *Enterobacter agglomerans* (Chernin *et al.*, 1996), *Serratia plymuthica* (De Vleeschauwer & Höfte, 2007) and different species of *Pseudomonas* or related genera (de Souza & Raaijmakers, 2003) described as potential biological control agents against several plant pathogens. Several pyrrolnitrin-producing bacteria have been described as biological control agents against *B. cinerea* (Janisiewicz & Roitman, 1988, Chernin *et al.*, 1996). Moreover, the antibiotic itself has been reported to inhibit the growth of bacteria (El-Banna & Winkelmann, 1998) and fungi (Levenfors *et al.*, 2004) including *B. cinerea* (Janisiewicz & Roitman, 1988, Hammer *et al.*, 1993, Schoonbeek *et al.*, 2002). It has also received much attention in the medical field due to its activity against some opportunistic fungal or bacterial human pathogens including the causal agent of tuberculosis (Biava *et al.*, 2007).

Some recent studies have shown that *B. cinerea* can withstand a wide variety of fungitoxic compounds from different origins, including the principal families of fungicides (Leroux *et al.*, 2002), the grapevine phytoalexin resveratrol (Schoonbeek *et al.*, 2001) and the antibiotic 2,4 diacetylphloroglucinol (2,4 DAPG) produced by *Pseudomonas* spp. (Schouten *et al.*, 2008). Thus, *B. cinerea* appears to be a very adaptable fungus. The multinucleate and possibly heterokaryotic nature of this fungus, the presence of transposons in the genome, the existence of virus-like particles and the possible occurrence of sexual reproduction (Beever & Weeds, 2004) may explain this high level of variability. These known biological properties of *B. cinerea* might, potentially, compromise the durability of biological control methods despite the commonly reported assumption that resistance of plant pathogens or pests to biological

Table 1 Characteristics, level of aggressiveness on tomato plants and on apple fruits, sensitivity to pyrrolnitrin and fungicides of *Botrytis cinerea* isolates used for the *in vitro* conidial-transfer experiments.

Isolate of <i>Botrytis cinerea</i>	Host	Year isolated	Aggressiveness ^a		Pyrrolnitrin	Active ingredients of fungicides (chemical family) ^b			
			tomato plant	apple		Carbendazim (Benzimidazoles)	Iprodione, procymidone, vinclozolin (Dicarboximides)	Fludioxonil (Phenylpyrroles)	Dicloran (Aromatic Hydrocarbons)
BC1	tomato	1989	+++	+++	S ^c	S	R	S	R
BC21	strawberry	1991	++	+++	S	S	S	S	S
BC25	tomato	1991	-	++	S	S	S	S	S
BC26	tomato	1991	+	++	S	S	R	S	R
H6	tomato	1991	-	+	S	R	S	S	S

^a +++ = high level of aggressiveness, ++ = moderate level of aggressiveness, + = low level of aggressiveness, - = not aggressive in our conditions of test

^b the concentrations of fungicides used are as follows: carbendazim 1 µg mL⁻¹, Iprodione 2.5 µg mL⁻¹, procymidone 10 µg mL⁻¹, vinclozolin 5 µg mL⁻¹, fludioxonil 0.1 µg mL⁻¹, dicloran 25 µg mL⁻¹

^c S = sensitive and R = resistant.

control agents will develop less frequently as compared to chemical control methods (Holt & Hochberg, 1997, Duffy *et al.*, 2003). Although information on the durability of biological control efficiency is scant, recent results concerning pest management in agricultural systems have shown that this assumption may not always be justified (Asser-Kaiser *et al.*, 2007). Moreover, inconsistent efficacy of biological control against plant pathogens still appears to be frequent in the field (Elad & Stewart, 2004). This fact is generally attributed to variable climatic conditions encountered in the field, the lack of ecological competence of the biological control agent, and/or an unstable quality of the products (Elad & Stewart, 2004). However, a possible reduction of efficacy of a biological control agent could also arise if plant pathogens produce natural mutants with reduced susceptibility to the biological control agents used on crops. Knowledge on the potential development of resistance to biological control agents can thus help to devise or improve resistance management strategies. The build-up of field resistance to biological control agents could result from the selection of pre-existing plant pathogen isolates with low susceptibility in natural populations or it could arise if plant pathogens have the ability to produce natural mutants with reduced susceptibility under the selection pressure of products used by farmers.

The main purpose of the present study was to assess the potential for build-up of resistance in *B. cinerea* isolates to pyrrolnitrin-producing biological control agents. To this end, successive generations were produced *in vitro* for five isolates of *B. cinerea*. Our specific objectives were (i) to monitor these generations for possible changes in sensitivity to pyrrolnitrin and to a pyrrolnitrin-producing biological control bacterium and in case of detection of resistant variants, (ii) to assess their fitness in comparison with the parent isolates and (iii) to evaluate the stability of the resistant phenotype by producing additional generations in absence of selection pressure.

Materials and methods

Isolates of *Botrytis cinerea*

Five single-spore isolates of *B. cinerea* originating from France were selected from a collection maintained in our laboratory (Table 1). The choice was made on the basis of differences in aggressiveness to tomato plants and apple fruits and of differences in patterns of resistance to six fungicides representing four chemical groups. All selected isolates were

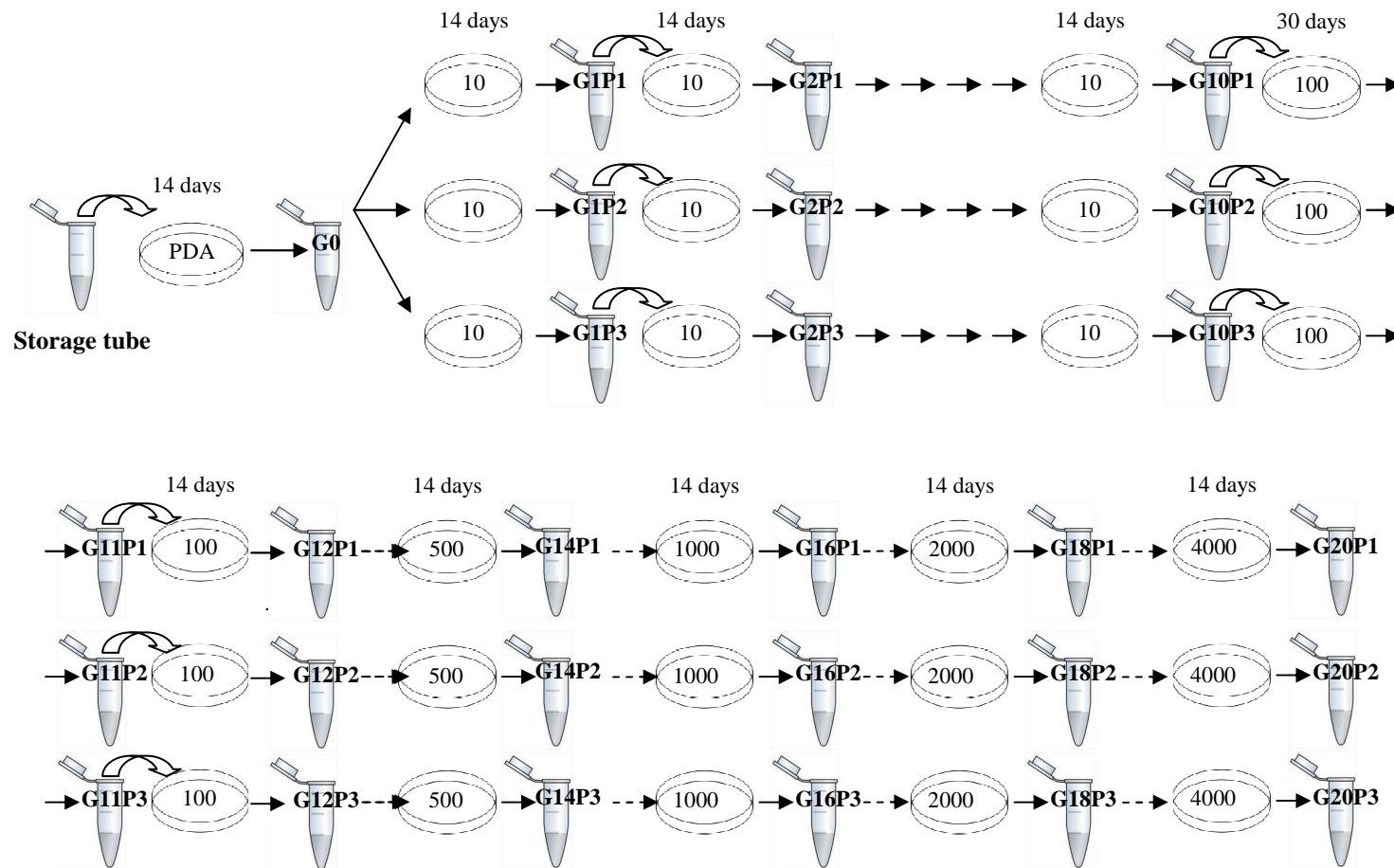


Figure 1 Presentation of the conidial-transfer procedure for *Botrytis cinerea* isolates. The concentration of pyrrolnitrin in $\mu\text{g L}^{-1}$ is indicated in the plates for every generation. For the pyrrolnitrin generations, the PDA medium was amended with $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of pyrrolnitrin until the 10th generation, then with increasing doses of pyrrolnitrin to reach $4000 \mu\text{g L}^{-1}$ at the 20th generation. Control generations were produced on PDA medium without pyrrolnitrin. Three independent conidial-transfer procedures (lineages 1, 2 and 3) were realised for each isolate. Every generation was transferred to a new plate every 14 days except the 11th generation which was incubated for 30 days.

sensitive to pyrrolnitrin. For the duration of this work, they were maintained in stock cultures stored at -20°C in a 0.06 M phosphate buffer containing 20% (V/V) of glycerol.

***In vitro* conidial-transfer experiment**

This experiment was carried out to produce 20 consecutive generations of spores on Potato Dextrose Agar medium (PDA 39 g L^{-1} ; Difco Laboratory) amended with pyrrolnitrin (purified microbial pyrrolnitrin $>95\%$, Sigma chemical). The pyrrolnitrin was dissolved in methanol and a stock solution containing 1 g L^{-1} was prepared and stored at 4°C in the dark to preserve its activity. Stored spore suspensions of the five isolates of *B. cinerea* were first inoculated on PDA medium without pyrrolnitrin. After 14 days of incubation at 21°C , spores were harvested from the plates in 2 mL of a phosphate-glycerol solution. This spore suspension represented the initial parental generation G0. To produce the next generation, this suspension was adjusted to 10^6 spores per mL, using a haemocytometer, and 40 μL aliquots were spread on Petri plates containing PDA medium amended with pyrrolnitrin at a final concentration of $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. After 14 days of incubation in the dark at 21°C , spores representing generation G1 were harvested in 2 mL of a phosphate-glycerol solution. The spore suspension was adjusted to 10^6 spores per mL and 40 μL aliquots were used to produce the next generation. The remaining suspension was stored at -20°C . From G0, ten successive generations (G1 to G10) were produced on PDA medium in the presence of $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ of pyrrolnitrin (Fig. 1). This concentration of pyrrolnitrin was determined, in a preliminary experiment described below, as the highest dose allowing sufficient conidial production by any of the five isolates of *B. cinerea* after 14 days of incubation at 21°C in the dark. Using the spores of generation G10, ten additional successive generations were produced in conditions of increasing selection pressure. The concentration of pyrrolnitrin in the PDA medium was progressively increased from $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ (for the production of the first ten generations) to $4000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ for the production of generation G20 (Fig. 1). Spores from alternate generations (G12, G14, G16, G18 and G20) were preserved at -20°C for further work. As a control, twenty successive generations were also produced on a pyrrolnitrin-free PDA medium.

For each of the five isolates, the whole experiment was carried out three times independently, providing three lineages of 20 generations produced under selection pressure (Fig. 1) and three independent "control" lineages produced on pyrrolnitrin-free PDA. To facilitate reading and avoid lengthy repetitions in the rest of this paper, control generations

produced on unamended PDA and generations produced in presence of pyrrolnitrin will be labelled GnC and GnP, respectively, where n indicates the generation rank in the lineage.

Determination of pyrrolnitrin sensitivity

In a preliminary experiment, we assessed the effect of pyrrolnitrin on mycelial growth and spore production by the parental generation of each isolate. This information was needed to determine the dose of pyrrolnitrin to be used in the production of successive generations under selective pressure as described above. In a second phase, sensitivity to pyrrolnitrin was tested on generations G1P, G2P, G3P, G4P, G5P, G7P, G10P, G12P and G20P for each of the 15 lineages generated under selection pressure. In addition, these tests were also conducted for generations G10C and G20C of the lineages produced on pyrrolnitrin-free medium for comparison.

The effect on mycelial growth was assessed on PDA medium containing different concentrations of pyrrolnitrin (0, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 and 13000 $\mu\text{g L}^{-1}$). To carry out this test, the spores of a given generation (including parental generation G0) were first transferred to unamended PDA medium and the plates were incubated for four days at 21°C in the dark. Mycelial plugs (5 mm in diameter) were then excised from the periphery of the growing colonies and transferred to the centre of fresh PDA Petri plates (90 mm in diameter) containing the desired concentrations of pyrrolnitrin. The plates were incubated at 21°C in the dark and colony diameter was monitored for four days after inoculation. For each of the three lineages per isolate, three replicate plates were used for each dose of pyrrolnitrin and the whole experiment was carried out three times independently. The 50% effective concentration (EC_{50}) was estimated as described by Leroux *et al.* (1999). A resistance factor (RF) was measured as the ratio of the average EC_{50} value of a given generation for a given isolate (mean for the three replicate lineages) over the EC_{50} value of the sensitive parent of the considered isolate (generation G0). Statistical analyses were performed separately for each isolate on the EC_{50} values, to test the hypothesis that the level of sensitivity to pyrrolnitrin remained identical for the successive generations. In these analyses, we used the ANOVA module of Statistica software to test both a possible lineage effect and a generation effect. When a significant effect was observed, the multiple comparison test of Student-Newman-Keuls was used to compare the means. The effect of pyrrolnitrin on spore production was assessed for the parental generation G0 of each isolate. Plates of PDA medium amended with different concentrations of pyrrolnitrin were inoculated in their centre

with a mycelial plug (5 mm in diameter) taken from the periphery of a 4-day-old colony. After 14 days of incubation at 21°C in the dark, the spores were scraped from the medium, suspended in water and spore concentration was determined using a haemocytometer. Three replicate plates were inoculated for each dose of pyrrolnitrin and the whole experiment was carried out three times independently. The data were analysed with Statistica software, using the three repetitions of the experiment as blocks and the individual plates as replications.

Stability of pyrrolnitrin resistance

To test the possibility of "reverse adaptation" of resistant variants in absence of selection pressure, we studied the resistant variants obtained at the 20th generation under selection pressure (G20P) for isolates BC1, BC25, BC26 and H6. For one lineage per isolate, spores of generation G20P were used to produce ten additional generations on PDA medium without pyrrolnitrin (G21 to G30). An incubation time of 14 days was applied between each successive generation. The EC₅₀ and RF values of the last generation (G30) were determined for each isolate as described above.

Interaction between *B. cinerea* and a pyrrolnitrin-producing bacterium

The antagonistic activity of a pyrrolnitrin-producing bacterium was tested *in vitro* against the parental generation G0 of four isolates of *B. cinerea* (BC1, BC25, BC26 and H6) and against some of their generations obtained under selection pressure (G10P and G20P). For this work, one lineage was used per isolate. We used strain ChPhzS24 of *Pseudomonas chlororaphis* (Mazurier *et al.*, 2009), which was kindly provided by P. Lemanceau (INRA Dijon, France). Confrontation tests were conducted on TSA medium (3 g L⁻¹ Tryptic Soy broth and 15 g L⁻¹ Agar) in 90 mm-diameter Petri plates. In each plate, the fungus (5 mm diameter mycelial plug) and the bacterium (20 µL droplet dosed at 10⁷ CFU per mL) were placed 25 mm apart. In control plates, a droplet of sterile distilled water was used instead of the bacterial suspension. Three replicate plates were inoculated for each test and incubated at 21°C in the dark. The whole experiment was conducted three times independently. Mycelial growth (radius in mm) was measured daily for five days after inoculation. For each test, the inhibition of mycelial growth was assessed with an index computed as [1- (radius of mycelial growth on control plates / radius of mycelial growth in presence of the bacterium)] x100. Additionally, the width of the inhibition zone was measured 5 days after inoculation. The level of

sensitivity to the bacterium between the pyrrolnitrin-sensitive parents (G0) and the generations (G10P and G20P) were compared using the ANOVA module of Statistica software. For a given isolate, the average of the inhibition of mycelial growth index and the width of the inhibition zone values of the three independent repetitions were used as elementary replicates. When a significant effect was observed, the multiple comparison test of Student-Newman-Keuls was used to compare the means.

Estimation of fitness cost *in vitro*

Different parameters of fitness were studied for the pyrrolnitrin-sensitive parental generation G0 and for several generations of isolates BC1, BC25, BC26 and H6 which presented reduced sensitivity to pyrrolnitrin. These fitness parameters were assessed on PDA medium and included spore germination, mycelial growth and spore production. Spore germination was first assessed after 24 hours of incubation. It was estimated by examining 100 arbitrarily-selected spores from each of three replicate plates. As all tests systematically resulted in the observation of 100% germination, an attempt was made to explore possible differences in the early stage of the germination process. To this end, germination was also quantified every hour during a six-hour incubation period at 21°C. The early kinetics of germination were assessed by computing an average hourly rate of germination for the period between the 3rd and the 6th hour after inoculation. Mycelial growth and spore production were assessed as described above for the determination of pyrrolnitrin sensitivity, except that plates were placed in a growth chamber with a photoperiod of 14 hours to hasten sporulation. Mycelial growth was assessed by measuring the diameter of colonies 3 days after inoculation and by estimating the daily radial growth rate between 1 and 4 days after inoculation. Sporulation was computed as spores produced per Petri plate 14 days after inoculation. The experiments were repeated three times, each with three replicates. Statistical analyses were performed separately for each isolate and each type of fitness parameter, to test the hypothesis that the fitness remained identical for the successive generations. In these analyses, we used the ANOVA module of Statistica software to test both a possible lineage effect and a generation effect. When a significant effect was observed, the multiple comparison test of Student-Newman-Keuls was used to compare the means.

Estimation of fitness cost *in planta*

To assess possible changes in aggressiveness, several generations were tested on apple fruits and tomato plants. For each generation of a given isolate, the aggressiveness of the three lineages was tested.

The aggressiveness of generations G0, G12P and G20P obtained with isolates BC1, BC25, BC26 and H6 was assessed on apple fruits cv. Golden. Generation G20C, produced on pyrrolnitrin-free medium, was included in all tests for comparison. In addition, generation G10P of BC26 was also tested because of its resistance to pyrrolnitrin. In these tests, three 2 mm-wounds were inflicted on the surface of the fruit and immediately inoculated with 10 μ L of a spore suspension of *B. cinerea* containing 10⁶ spores per mL. Apples were incubated in a growth chamber at 21°C. The diameter of lesions was monitored daily for 7 days after inoculation.

Tests on tomato plants cv. Monalbo (INRA, Avignon, France) were conducted for generations G0, G12P and G20P of isolate BC1 and for generations G0, G10P, G12P and G20P of isolate BC26. Generation G20C, produced on pyrrolnitrin-free medium, was included in all tests for comparison. Two types of bioassays were used with two independent sets of plants. To test the aggressiveness of *B. cinerea* on the stem, leaves were removed from the plants leaving a 5 mm petiole stub on the stems and 10 μ L of spore suspension were deposited on the petiole stub. Because isolate BC26 was known to have a low level of aggressiveness on tomato plants (Table 1), we used a spore concentration of 10⁶ spores per mL for isolate BC1 and of 10⁷ spores per mL for BC26. The lengths of resulting stem lesions were monitored daily for 7 days after inoculation. The aggressiveness of generations G0, G10P, G12P, G20P and G20C of isolate BC26 was also tested on petioles. To this end, leaves were removed from the plants leaving a 50 mm petiole stub and 10 μ L of spore suspension containing 10⁷ spores per mL were deposited on the wound. The length of lesions on petiole stubs was monitored daily for 7 days after inoculation. All plants were incubated in a growth chamber with a photoperiod of 14 hours and maintained at 21°C with a relative humidity above 90%.

The experiments were all repeated three times independently per lineage, each with three replicate plants or fruits. To take into account the kinetics of disease development for each isolate, we computed the AUDPC as described by Decognet *et al.* (2009). Statistical analyses were performed separately for each isolate on the AUDPC values, to test the hypothesis that

Table 2 Level and stability of resistance to pyrrolnitrin of the different generations produced from the five isolates of *Botrytis cinerea* BC1, BC21, BC25, BC26 and H6. The generations G0, G7P, G10P, G12P, and G20P are respectively the wild-type parent isolates, the 7th, the 10th, the 12th and the 20th generation produced in presence of pyrrolnitrin in the medium. For BC21, generations were not pursued after the 7th generation. The generation G30 is the 30th generation obtained from G20 by producing 10 consecutive generations on PDA medium without pyrrolnitrin.

Isolate of <i>Botrytis cinerea</i>	Generation tested	EC ₅₀ (µg.L ⁻¹) ^a	RF ^b
BC1	G0	5.1 ± 0.1	
	G10P	9 ± 1	1.7
	G12P	8700 ± 1100	1700
	G20P	8700 ± 1100	1700
	G30	8700 ± 1100	1700
BC21	G0	7 ± 1	
	G7P	7 ± 1	1
BC25	G0	5 ± 2	
	G10P	9 ± 1	1.8
	G12P	9000 ± 600	1800
	G20P	9000 ± 600	1800
	G30	9000 ± 700	1800
BC26	G0	6 ± 1	
	G10P	63 ± 13	11
	G12P	7200 ± 500	1200
	G20P	7400 ± 400	1230
	G30	7400 ± 500	1230
H6	G0	1.3 ± 0.3	
	G10P	7 ± 1	5.4
	G12P	4600 ± 100	3540
	G20P	4600 ± 100	3540
	G30	4600 ± 200	3540

^a average values obtained with three replicate lineages ± standard error of the mean

^b RF = resistance factor calculated by dividing the EC₅₀ value of each of the generations tested by the EC₅₀ value of the sensitive parent of the considered isolate (G0)

the level of aggressiveness remained identical for the different generations. In these analyses, we used the ANOVA module of Statistica software to test both a possible lineage effect and a generation effect. When a significant effect was observed, the multiple comparison test of Student-Newman-Keuls was used to compare the means.

Results

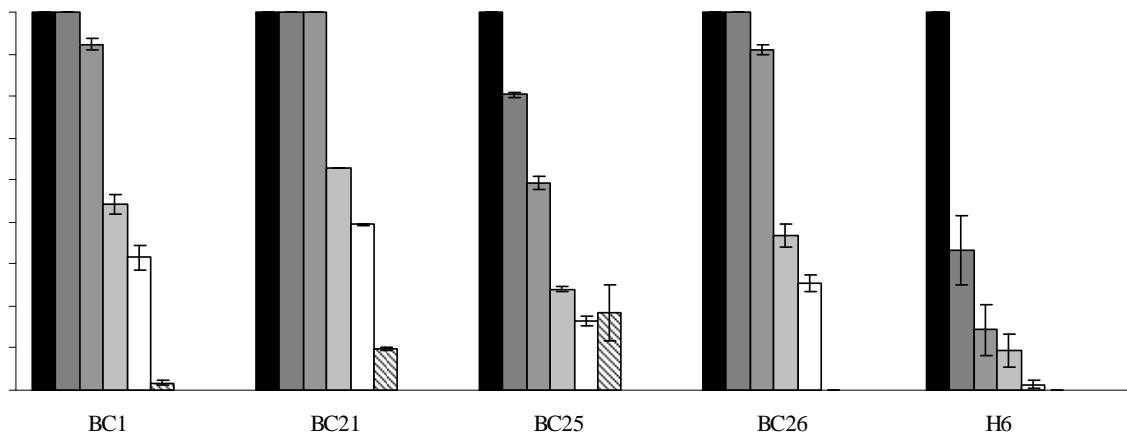
Sensitivity to pyrrolnitrin of the wild-type parent isolates

The mycelial growth of the five isolates used in this study (parental generation G0) was highly affected by pyrrolnitrin, with estimated values of EC_{50} comprised between 1 and 7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Table 2). At 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ pyrrolnitrin, the inhibition of mycelial growth ranged between 56.3% and 98.5% (respectively 64.8%, 56.3%, 81.9%, 71.9% and 98.5% for BC1, BC21, BC25, BC26 and H6). For a dose of pyrrolnitrin of 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ or greater, the mycelial growth of all five isolates was completely inhibited (Fig. 2).

Spore production of the five isolates was also significantly affected by pyrrolnitrin (ANOVA, $P = 0.009$ for BC1, $P = 0.011$ for BC21, $P = 0.039$ for BC25, $P < 0.0001$ for BC26 and $P < 0.0001$ for H6) (Fig. 2). At 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ pyrrolnitrin, sporulation was completely inhibited for three of the isolates and for higher concentrations the inhibition was complete for all isolates (Fig. 2). The dose of 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ pyrrolnitrin resulted in a reduction of spore production of $93.9 \pm 1.3\%$ (average for the five isolates \pm standard error) compared to the control without pyrrolnitrin. It allowed the production of spores in a range from 2.6×10^5 to 9.0×10^6 spores per 90 mm-diameter Petri plate depending on the isolate (Fig. 2). This dose of pyrrolnitrin was thus selected for the production of successive generations under selection pressure.

Sensitivity to pyrrolnitrin of successive generations produced under selection pressure

For all isolates tested, there was no significant change in the level of resistance to pyrrolnitrin for the control generations G10C and G20C produced in absence of pyrrolnitrin (ANOVA, $P > 0.05$). In contrast, changes in sensitivity were observed among the successive generations produced on PDA medium amended with pyrrolnitrin. The patterns of change were different among the five isolates. For isolate BC26, sensitivity to pyrrolnitrin was significantly reduced



B

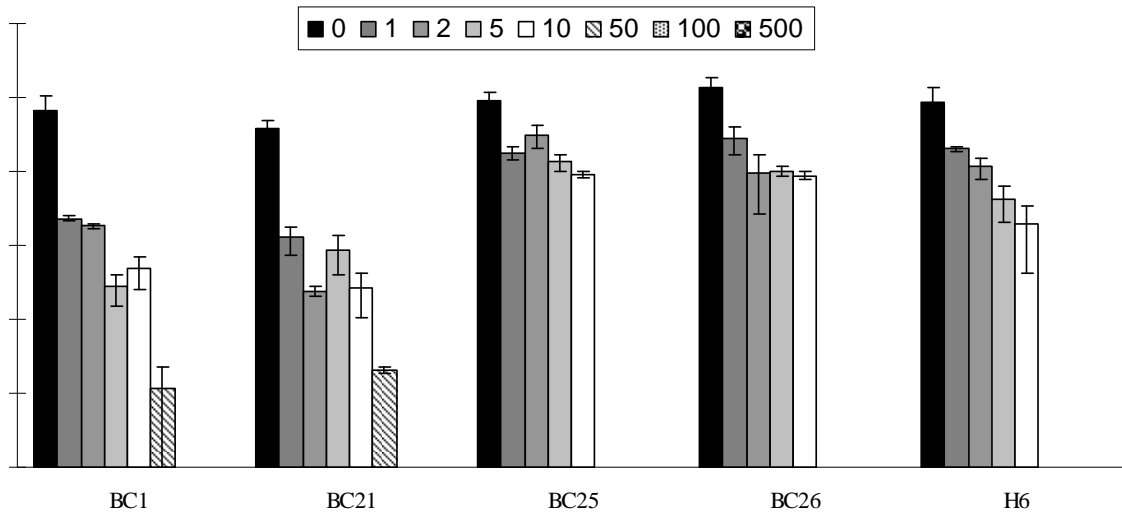


Figure 2 Colony diameter (A) and spore production (B) estimated respectively 4 and 14 days after inoculation, for parental generation G0 of five *Botrytis cinerea* isolates on PDA medium amended with different concentrations of pyrrolnitrin (in $\mu\text{g L}^{-1}$). Each bar represents the average value for three independent repetitions. Error bars indicate the standard error of the mean.

after only four successive generations (Fig. 3). The phenomenon was identical for each of the three independent replicate lineages of this isolate and no significant differences among these lineages were observed in any of the sensitivity tests conducted for generations G4P, G5P, G7P or G10P (ANOVA, $P > 0.05$). The estimated EC_{50} of this isolate remained similar between G5P and G10P, with a corresponding resistance factor of *ca.* 11 (Fig. 3, Table 2). For isolates BC1, BC25 and H6, the level of resistance was almost unchanged after 10 generations on $10 \mu\text{g L}^{-1}$ pyrrolnitrin (Fig. 3, Table 2). In contrast, the sporulation of all three replicate lineages of isolate BC21 was so reduced after 7 generations on pyrrolnitrin-amended medium that it was impossible to produce a generation G8P with this isolate (Fig. 3). Work was thus pursued with only isolates BC1, BC25, BC26 and H6.

For these four isolates, spores from the 10th generation (G10P) were transferred to fresh PDA containing a higher concentration of pyrrolnitrin (Fig. 1). All replicate lineages for each isolate were able to grow and sporulate on $100 \mu\text{g L}^{-1}$ pyrrolnitrin, producing an 11th generation (G11P). This contrasted with the total inhibition observed with such a concentration for the parental generation G0 of all five isolates (Fig. 2). However, to obtain a sufficient number of spores for the production of the next generation, the incubation of generation G11P was extended from 14 to 30 days (Fig. 1). Following this step, the next generations (G12P to G20P) were all obtained after 14 days of incubation despite the gradual increase in the concentration of pyrrolnitrin (Fig. 1). After a total of 20 successive generations, the last 10 of which produced on increasing doses of pyrrolnitrin, high levels of resistance were obtained and the resistance factors were greater than 1000 for the 4 isolates (Table 2). As indicated by the small standard errors, similar values were obtained for the three lineages of each isolate (Table 2). The resistance factor did not increase from the 12th to the 20th generation (Fig. 3). This pattern of change in the resistance was similar for the four isolates even if they differed significantly in the maximum EC_{50} values achieved after 12 generations (ANOVA, $P = 0.005$, Table 2).

Stability of pyrrolnitrin-resistant variants

Using pyrrolnitrin-resistant generation G20P to produce ten additional generations on pyrrolnitrin-free medium did not lead to any decrease in sensitivity to the antibiotic for any of the isolates. In all cases, there was no significant difference between the EC_{50} values for generation G20P and G30 (Table 2).

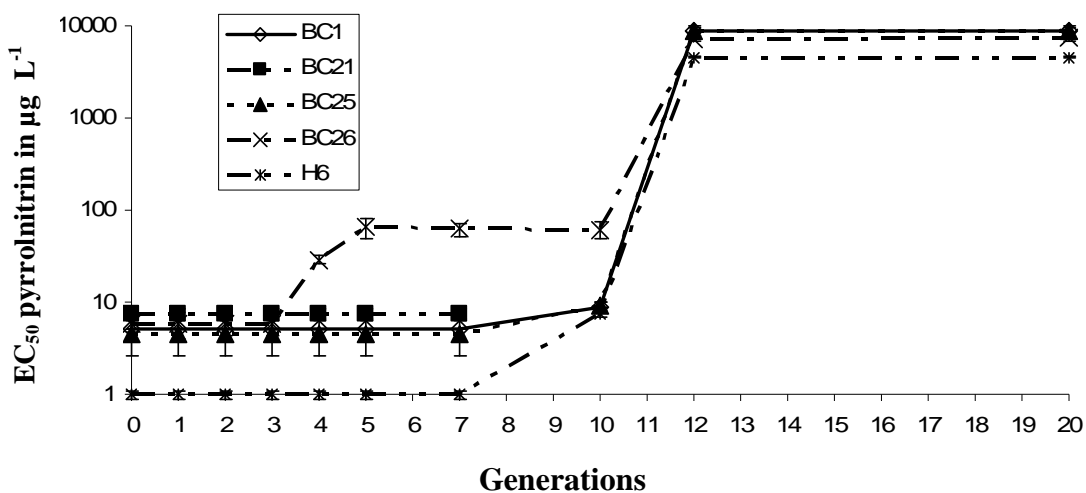


Figure 3 Evolution of resistance to pyrrolnitrin for 5 isolates of *Botrytis cinerea* maintained for 20 successive generations on PDA amended with pyrrolnitrine. From parental generation G0, ten successive generations (G1P to G10P) were produced in the presence of 10 µg L⁻¹ of pyrrolnitrin. Using the spores of generation G10, ten additional successive generations were produced in conditions of increasing selection pressure. The concentration of pyrrolnitrin in the PDA medium was progressively increased from 100 µg L⁻¹ for the production of the 11th generation to 4000 µg L⁻¹ for the production of generation G20. The 50% effective concentration (EC₅₀) was estimated for the generations G0 - G5, G7, G10, G12 and G20. Values of EC₅₀ correspond to the average of the 3 independent lineages and error bars indicate the standard error of the mean.

***In vitro* interaction with pyrrolnitrin-producing bacteria**

In vitro confrontations of pyrrolnitrin-producing strain ChPhzS24 of *P. chlororaphis* with parental generation G0 of any of the isolates resulted in a measurable inhibition zone and substantial growth inhibition of *B. cinerea* (Fig. 4; Table 3). Inhibition also occurred with generation G20P, but for all isolates it was significantly reduced in comparison with G0. For generations G10P, there was no significant difference in inhibition by *P. chlororaphis* in comparison with generation G0 even of isolate BC26 which showed moderate resistance to pyrrolnitrin (Table 3).

***In vitro* fitness cost for pyrrolnitrin-resistant variants**

No significant differences were observed between the pyrrolnitrin-sensitive parents G0 and the resistant generations G20P for germination rate on PDA medium (ANOVA, $P > 0.05$, Table 4). There was no significant lineage effect for mycelial growth and sporulation on PDA medium of any of the isolates ($P > 0.05$). For every isolate on the other hand, the mycelial growth of the resistant variants G12P and G20P was significantly reduced ($P < 0.002$) compared with the pyrrolnitrin-sensitive parent G0 and the control generation G20C (Table 4, Fig. 4A and B). Spore production of the pyrrolnitrin-resistant variants G12P and G20P was also significantly reduced ($P < 0.009$) for every isolate compared with the pyrrolnitrin-sensitive parents G0 and the control generation G20C (Table 4).

Level of aggressiveness of pyrrolnitrin-resistant variants on plant tissues

There was no significant lineage effect for the aggressiveness of any of the isolates ($P > 0.05$). For each of the four isolates tested, the pyrrolnitrin-resistant variants G12P and G20P were significantly less aggressive on apple fruits than the parental generation G0 and control generation G20C (Table 4). On tomato plants, a decrease of aggressiveness was also observed with generations G12P and G20P of isolates BC1 and BC26 compared with the parental generations G0 (Table 4).

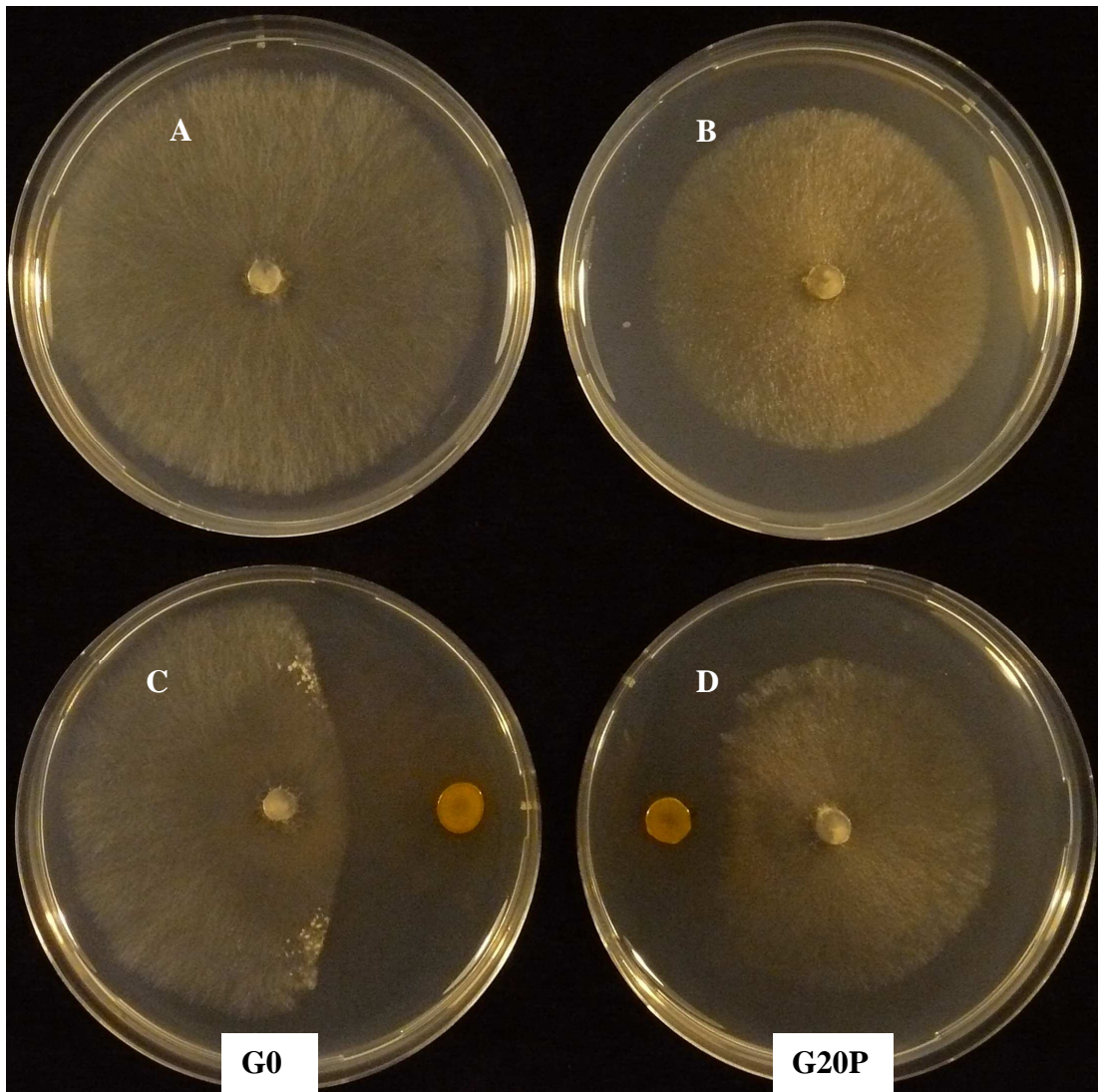


Figure 4 *In vitro* sensitivity of *Botrytis cinerea* isolate BC1 to the pyrrolnitrin-producing *Pseudomonas chlororaphis* strain ChPhzS24. The pyrrolnitrin-sensitive parent isolate (G0) and the pyrrolnitrin-resistant variant (G20P) were compared 5 days after inoculation. Control plates A and B show mycelial growth of G0 and G20P on TSA medium without the bacterium. The effect of the bacterium on G0 and G20P is exemplified by plates C and D.

Table 3 *In vitro* sensitivity of the pyrrolnitrin-sensitive and resistant variants of *Botrytis cinerea* to the pyrrolnitrin-producing bacterial strain *Pseudomonas chlororaphis* ChPhzS24. G0, G10P and G20P are respectively the wild-type parent isolates, the 10th generation and the 20th generation obtained in presence of pyrrolnitrin in the medium. Inhibition of mycelial growth index and width of the inhibition zone were estimated 5 days after inoculation. Data are means of three independent tests.

Isolate of <i>Botrytis cinerea</i>	Generation tested	Pyrrolnitrin (RF) ^a	Effect of <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ChPhzS24			
			Growth inhibition (%) ^b		Inhibition zone (mm)	
BC1	G0		74.8	a	18.3	a
	G10P	1.7	72.6	a	19.3	a
	G20P	1700	36.5	b	7.0	b
BC25	G0		66.7	a	19.5	a
	G10P	1.8	63.7	a	20.0	a
	G20P	1800	6.5	b	7.5	b
BC26	G0		74.6	a	16.6	a
	G10P	11	69.2	a	13.0	ab
	G20P	1230	17.9	b	8.5	b
H6	G0		64.4	a	23.2	a
	G10P	5.4	58.9	a	20.9	a
	G20P	3540	34.3	b	3.5	b

^a RF= resistance factor calculated by dividing the EC₅₀ value of each of the generations tested by the EC₅₀ value of the sensitive parent of the considered isolate (G0). For each isolate, means within a column followed by the same letter are not significantly different (ANOVA, $\alpha = 0.05$; Newman-Keuls test).

^b Growth inhibition = [1- (radius of mycelial growth on control plates in mm / radius of mycelial growth in presence of the bacteria in mm)] x100

Table 4 Comparison of fitness between pyrrolnitrin-resistant generations, control generations and the wild-type parent isolates G0. The different components of fitness evaluated are: hourly germination rate between the 3rd and 6th hour of incubation (% per hour), colony diameter 3 days after inoculation (mm), daily radial growth rate between the first and 4th day after inoculation (mm per day), spore production on PDA medium 14 days after inoculation (number of spores produced per Petri plate) and aggressiveness on tomato plant and apple fruits.

Isolate of <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i>	Generation tested	Hourly germination rate ^a		Mycelium ^a		Sporulation ^a		Aggressiveness (AUDPC) ^a							
		% per hr	a	colony diameter mm	a	daily radial growth mm/day	x10 ⁶ spores per plate	a	tomato plant		apple				
									petiole stub	stem	a				
BC1	G0 ^b	15.0	a	76.3	a	23.0	a	156	a	-	82.2	a	184.1	a	
	G20C	- ^c		79.0	a	25.1	a	157	a	-	68.3	a	139.0	a	
	G12P	-		38.3	b	12.0	b	66	b	-	10.3	b	20.0	b	
	G20P	16.5	a	36.7	b	12.4	b	40	b	-	7.3	b	19.3	b	
BC25	G0	12.3	a	67.3	a	22.3	a	130	a	-	-	-	126.7	a	
	G20C	-		66.7	a	23.4	a	98	a	-	-	-	124.1	a	
	G12P	-		41.0	b	13.5	b	47	b	-	-	-	54.3	b	
	G20P	9.2	a	40.3	b	14.6	b	34	b	-	-	-	49.1	b	
BC26	G0	22.0	a	58.5	a	23.6	a	155	a	66.6	a	10.4	a	114.0	a
	G20C	-		55.7	a	23.7	a	66	b	83.1	a	16.5	a	111.1	a
	G10P	-		56.5	a	21.0	a	-		87.4	a	9.0	a	97.1	b
	G12P	-		38.0	b	14.0	b	32	c	-	-	-	24.7	c	
	G20P	19.7	a	35.0	b	14.2	b	32	c	9.1	b	0.0	b	19.3	c
H6	G0	20.0	a	54.3	a	19.7	a	105	a	-	-	-	89.5	a	
	G20C	-		50.3	a	18.3	a	92	a	-	-	-	94.3	a	
	G12P	-		18.0	b	6.0	b	46	b	-	-	-	28.7	b	
	G20P	17.3	a	15.0	b	6.7	b	16	c	-	-	-	22.0	b	

^a Data are means of the three lineages. For each isolate, means within a column followed by the same letter were not significantly different (ANOVA, $\alpha = 0.05$; Newman-Keuls test).

^b G0 is the wild-type parent isolate, G20C is the 20th generation produced on PDA medium without pyrrolnitrin (control). G10P, G12P and G20P are respectively the 10th, the 12th and the 20th generation produced on PDA amended with pyrrolnitrin (10 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively).

^c - = not done or not relevant

Discussion

The present study provides for the first time evidence that a fungal plant pathogen is able to gradually build-up resistance to an antibiotic produced by a biological control agent. A high level of resistance to pyrrolnitrin appeared when *B. cinerea* was continuously exposed to the antibiotic pyrrolnitrin, indicating its capacity of adaptation in laboratory conditions. This adaptation was observed rapidly after the 10th generation following an increase in the concentration of pyrrolnitrin used in the medium. It was observed for all the isolates tested regardless of their original phenotypic differences, suggesting an absence of isolate effect in the build-up of resistance. It was not possible to assess *in planta* the efficacy of biocontrol by the pyrrolnitrin-producing bacterium *P. chlororaphis* ChPhzS24 against the pyrrolnitrin-resistant generations G20P, due to the loss of aggressiveness of these generations. Nevertheless, *in vitro* tests revealed that the resistance of *B. cinerea* to pyrrolnitrin was associated with a decrease in the antagonistic effect of the bacterium.

However, the small remaining inhibition zones observed around the bacterial colonies in confrontation tests suggest that the pyrrolnitrin-resistant variants were not completely resistant to the bacterium. A possible explanation for this phenomenon may be related to the concentration of pyrrolnitrin present in the vicinity of the bacterium in the medium. Although the quantity of pyrrolnitrin produced by strain ChPhzS24 of *P. chlororaphis* on PDA medium is not known, one may hypothesise that resulting concentrations could be greater than those used in our tests to determine the level of resistance of *B. cinerea* to pyrrolnitrin *in vitro*. Another explanation could be that the variants of *B. cinerea* obtained on pyrrolnitrin-amended medium were probably not resistant to another antibiotic, phenazine-1-carboxylic acid, possibly also produced by strain ChPhzS24 of *P. chlororaphis* (Schoonbeek *et al.*, 2002).

Spore production in the presence of a high concentration of pyrrolnitrin (100 µg L⁻¹) was possible for the G10 variants of four isolates whereas it was not possible for the sensitive parental generation G0. This suggests that isolates already exposed to pyrrolnitrin may be better prepared to adapt to pyrrolnitrin-rich environments compared to isolates that have never been exposed to this antibiotic. Luo & Schnabel (2008) already proposed that the various levels of resistance to fungicides generated for different isolates of *Monilinia fructicola* may be linked to their original frequency of exposure to the fungicides under study. Therefore, this fungus may have reacted to its selective environment by accumulating some adaptive

mutations, which may not necessarily include mutations that have a direct consequence on the resistance to the antibiotic (Rosenberg, 2001).

Previous studies have shown that the resistance of a fungus to a fungicide may predispose the resistance to other fungicides and evidence of such predisposition has been documented for *Monilinia fructicola* (Luo & Schnabel, 2008) and *Venturia inaequalis* (Koeller & Wilcox, 2001). This study does not show a similar phenomenon for the resistance of *B. cinerea* to pyrrolnitrin. When *B. cinerea* isolates were subjected to a stable and relatively low dose of pyrrolnitrin before the 10th generation (10 µg L⁻¹), susceptibility to the antibiotic significantly evolved only for one of the five isolates tested (BC26). For this isolate, no evidence of predisposition was established as its fungicide-resistance pattern was not different from that of another isolate tested (BC1). Moreover, the speed of selection by pyrrolnitrin was not accelerated for the 4 other isolates tested whatever their pattern of fungicides resistance. Therefore, it appears that the development of pyrrolnitrin resistance in *B. cinerea* is independent of its original profile of resistance to fungicides.

Fitness is a key parameter for the build-up of resistance in the field. In this study, the resistance of *B. cinerea* variants to pyrrolnitrin was systematically associated with reduced growth potential (mycelial growth and spore production) and decreased aggressiveness on plants or fruits (reduction of lesion growth). This fitness cost was similarly high for the four isolates tested. Based on these results, we postulate that traits involved in resistance may be genetically linked to fitness cost and work is in progress to test this hypothesis. One practical consequence of this phenomenon is that if pyrrolnitrin resistance occurred in the field, the associated detrimental effect on the variant and competition from pyrrolnitrin-sensitive strains would limit the risk of complete loss of efficacy of pyrrolnitrin-producing biological control agents.

Several experimental studies have evaluated the relationship between fitness and fungicide resistance for *B. cinerea*, but results are quite contradictory to each other (Vignutelli *et al.*, 2002, Moyano *et al.*, 2004, Ziogas *et al.*, 2005, Bardas *et al.*, 2008). Bardas *et al.* (2008) showed for instance that the resistance of *B. cinerea* to the anilinopyrimidine fungicides did not affect their fitness compared to the sensitive isolates. However, our results are consistent with results reported by Ziogas *et al.* (2005) concerning the resistance of *B. cinerea* to fludioxonil, a fungicide whose structure is close to that of pyrrolnitrin (Leroux *et al.*, 2002). A comparison of fitness among wild-type isolates and fludioxonil-resistant mutants of *B.*

cinerea showed that all fludioxonil-resistant mutants had significant reductions in the characteristics that determine saprophytic fitness, such as mycelial growth, sporulation, conidial germination and sclerotial production (Ziogas *et al.*, 2005). According to these authors, the polygenic control of resistance to fludioxonil may be responsible for the reduced fitness of fludioxonil-resistant isolates of *B. cinerea* obtained in the laboratory (Ziogas *et al.*, 2005). Concerning biological control, experimental evidence of fitness costs associated with resistance has only been reported for pests. For instance, selection experiments have shown that resistance of *Drosophila melanogaster* to parasitoids imposes fitness costs (Kraaijeveld & Godfray, 1997). To our knowledge, the present study is the first report of such a phenomenon for a plant pathogen.

The extent to which an organism is selected in a population depends on the advantages that the resistance provides but also on the costs of maintaining the resistance in the population in the absence of selection pressure. Ziogas *et al.* (2005) showed that fludioxonil-resistant variants of *B. cinerea* reverted to decreased resistance when they were grown in absence of the fungicide. In contrast in the present study, the level of resistance to pyrrolnitrin remained stable for 10 successive generations produced on pyrrolnitrin-free medium. This trait may constitute a risk factor in the field, if subsequent mutations could improve the fitness of the resistant variants as observed for antibiotic-resistant bacterial mutants (Andersson & Levin, 1999). Furthermore, the genetic recombination associated with sexual reproduction may produce new phenotypes in the population. Population genetics studies have revealed high levels of variability in *B. cinerea* and a lack of linkage disequilibrium within populations from different countries, suggesting that this fungus may undergo sexual reproduction (Giraud *et al.*, 1997, Karchani-Balma *et al.*, 2008, Vaczy *et al.*, 2008).

In practical terms, the development of reduced susceptibility to pyrrolnitrin in *B. cinerea* populations, if it should occur, may not necessarily jeopardize the efficacy of pyrrolnitrin-producing biocontrol agent. However, loss of efficacy of a biological control agent was already described for *B. cinerea*. Li & Leifert (1994) have shown that after 10 successive treatments on plants with the antibiotic-producing bacterium *Bacillus subtilis*, its efficacy against *B. cinerea* dropped dramatically. But the biological control activity of a given microorganism may be associated with other mechanisms in addition to antibiosis, and it was suggested that many biological control agents suppress disease by using more than one mode of action (Elad & Stewart, 2004). Furthermore, it was suggested that resistance to complex or multiple antagonistic traits should occur only at a low frequency (Duffy *et al.*, 2003). In future

studies on biological control, nevertheless, it may be prudent to include work on the durability of efficacy of the biological control agents having multiple modes of action.

Acknowledgements

The authors grateful acknowledge Claire Troulet, Gisèle Riqueau and François Orny for excellent technical assistance in the plant and fruit tests. The technical and scientific assistance of Pierre Leroux, Anne Sophie Walker, Johan Confais, Christel Leyronas and Mohamed El Maataoui were also greatly appreciated. This work was supported in part by the French National Research Agency (ECOSERRE project) and by a grant from INRA (SPE project). S. Ajouz was supported by a grant from the Syrian government to complete a PhD.

References

- Andersson DI, Levin BR, 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 489-93.
- Asser-Kaiser S, Fritsch E, Undorf-Spahn K, Kienzle J, Eberle KE, Gund NA, Reineke A, Zebitz CPW, Heckel DG, Huber J, Jehle JA, 2007. Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science* **317**, 1916-8.
- Bardas GA, Myresiotis CK, Karaoglanidis GS, 2008. Stability and fitness of anilinopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **98**, 443-50.
- Beever RE, Weeds PL, 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delan N, eds. *Botrytis: biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 29-52.
- Biava M, Porretta GC, Poce G, Supino S, Sleiter G, 2007. New pyrroles with potential antimycobacterial, antifungal and selective COX-2 inhibiting activities. Synthetic methodologies. *Current Organic Chemistry* **11**, 1092-112.
- Chernin L, Brandis A, Ismailov Z, Chet I, 1996. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Current Microbiology* **32**, 208-12.
- de Souza JT, Raaijmakers JM, 2003. Polymorphisms within the prnD and pltC genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 21-34.

- Decognet V, Bardin M, Trottin-Caudal Y, Nicot PC, 2009. Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathology* **99**, 185-93.
- De Vleeschauwer D, Höfte M, 2007. Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plants. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **2**, N0 046, 12 pp.
- Duffy B, Schouten A, Raaijmakers JM, 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 501-38.
- El-Banna N, Winkelmann G, 1998. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 69-78.
- Elad Y, Stewart A, 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delan N, eds. *Botrytis: biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 223–41.
- Elmer PAG, Reglinski T, 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* **55**, 155-77.
- Giraud T, Levis C, Fortini D, Leroux P, Brygoo Y, 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 1177-85
- Hammer PE, Evensen KB, Janisiewicz WJ, 1993. Postharvest control of *Botrytis cinerea* on cut flowers with pyrrolnitrin. *Plant Disease* **77**, 283-6.
- Holt RD, Hochberg ME, 1997. When is biological control evolutionarily stable (or is it)? *Ecology* **78**, 1673-83.
- Janisiewicz WJ, Roitman J, 1988. Biological control of blue mold and grey mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* **78**, 1697-700.
- Jarvis WR, 1980. Epidemiology. In: Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR, eds. *The Biology of Botrytis*. London, UK: Academic Press, 219-50.
- Karchani-Balma S, Gautier A, Raies A, Fournier E, 2008. Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology* **98**, 1271-9.
- Koeller W, Wilcox MH, 2001. Evidence for the predisposition of fungicide-resistant isolates of *Venturia inaequalis* to a preferential selection for resistance to other fungicides. *Phytopathology* **91**, 776-81.

- Kraaijeveld AR, Godfray HCJ, 1997. Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **389**, 278-80.
- Leroux P, 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. The Netherlands: Kluwer Academic Press, 195-222.
- Leroux P, Chapeland F, Desbrosses D, Gredt M, 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* **18**, 687-97.
- 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**, 876-88.
- Levenfors JJ, Hedman R, Thaning C, Gerhardson B, Welch CJ, 2004. Broad-spectrum antifungal metabolites produced by the soil bacterium *Serratia plymuthica* A 153. *Soil Biology & Biochemistry* **36**, 677-85.
- Li H, Leifert C, 1994. Development of resistance in *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Whetzel against the biological control agent *Bacillus subtilis* CL27. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **101**, 414-8.
- Luo CX, Schnabel G, 2008. Adaptation to fungicides in *Monilinia fructicola* isolates with different fungicide resistance phenotypes. *Phytopathology* **98**, 230-8.
- Mazurier S, Corberand T, Lemanceau P, Raaijmakers JM, 2009. Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. *The ISME Journal*, 3:977-991.
- Moyano C, Gomez V, Melgarejo P, 2004. Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *Journal of Phytopathology* **152**, 484-90.
- Rosenberg SM, 2001. Evolving responsibility: adaptive mutation. *Nature Reviews Genetics* **2**, 504-15.
- Schoonbeek H, Raaijmakers JM, Waard MAd, 2002. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 1165-72.
- Schoonbeek H, Sorbo Gd, Waard MAd, 2001. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 562-71.
- Schouten A, Maksimova O, Cuesta-Arenas Y, Berg Gvd, Raaijmakers JM, 2008. Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea*

against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology* **10**, 1145-57.

Vaczy KZ, Sandor E, Karaffa L, Fekete E, Arnyasi M, Czeglédi L, Kovics GJ, Druzhinina IS, Kubicek CP, 2008. Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards. *Phytopathology* **98**, 1312-9.

Vignutelli A, Hilber-Bodmer M, Hilber UW, 2002. Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*. *Mycological Research* **106**, 329-35.

Ziogas BN, Markoglou AN, Spyropoulou V, 2005. Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *European Journal of Plant Pathology* **113**, 83-100.

Chapitre IV

Comparaison du développement *in vitro* et *in planta* d'un mutant de *Botrytis cinerea* résistant à la pyrrolnitrine et de sa souche mère sensible.

Publication 3

Comparison of the development *in vitro* and *in planta* of a pyrrolnitrin-resistant mutant of *Botrytis cinerea* and its sensitive wild-type parent isolate.

S. Ajouz, M. Bardin, P. C. Nicot and M. El Maâtaoui

(soumis à European Journal of Plant Pathology)

Comparison of the development *in vitro* and *in planta* of a pyrrolnitrin-resistant mutant of *Botrytis cinerea* and its sensitive wild-type parent isolate

Sakhr Ajouz, Marc Bardin, Philippe C. Nicot and Mohamed El Maâtaoui

S. Ajouz, M. Bardin (✉), P. C. Nicot

INRA, UR407, Plant Pathology Unit, Domaine St Maurice, F-84140 Montfavet, France

e-mail: marc.bardin@avignon.inra.fr ; Phone: +33 432 72 28 55 . Fax: +33 432 72 28 42

M. El Maâtaoui

Université d'Avignon, BP 21239 F-84916 Avignon Cedex 9

INRA, UMR 406 UAPV/INRA, F-84914 Avignon, France

Keywords aggressiveness, cytopathology, fitness, light microscopy, quasi-isogenic lines, tomato plant

Abstract The development of two quasi-isogenic lines of *Botrytis cinerea* differing in their level of resistance to pyrrolnitrin was compared in tomato plants and on PDA medium. In tomato plants, significant differences in the percentage of infected petioles one day after inoculation and in symptom progression on petioles and stems were observed between the resistant mutant and the sensitive wild-type parent suggesting a difference in their level of aggressiveness. Cytohistological investigations revealed that, from 6 hours after inoculation, conidia of both quasi-isogenic lines germinated and that from 12 hours after inoculation, mycelium developed within petiole tissues. However, while the wild-type parent isolate spread throughout the petiole and rapidly, from 72 hours, invaded the stem tissues *via* the leaf-abscission zone, the pyrrolnitrin-resistant mutant failed to extend beyond petiole tissues to invade the stem. Moreover, from 72 hours, the mycelium development of the pyrrolnitrin-resistant mutant was accompanied by abnormal glycogen accumulation and chlamydospore-like cells formation. In contrast, wild-type parent mycelium was normally structured with intensive colonization of stem tissues. Additionally, on PDA medium the mycelium of the pyrrolnitrin-resistant mutant proved to be less vigorous than the wild-type isolate. Together, these results suggest that the acquisition of pyrrolnitrin-resistance in *B. cinerea* is accompanied by changes in mycelial structure and reduction in mycelial growth leading to a noticeable loss of aggressiveness on tomato plants.

Introduction

Gray mould, caused by the fungus *Botrytis cinerea* Pers.:Fr (teleomorph *Botryotinia fuckeliana* [(de Bary) Whetzel]) is a severe disease on a wide range of economically important crops. Disease control generally relies on chemicals (Leroux 2004; Rosslenbroich and Stuebler 2000), although biological control strategies have been intensively studied over the last three decades (Blakeman and Fokkema 1982; Elad and Stewart 2004). In greenhouse production of tomato, this fungus can develop on leaves, stems, flowers and fruits (Dik and Wubben 2004). On stems, symptoms consist of cankers which result from the infection of the pruning wounds caused by the removal of leaves throughout the growing season (Dik and Wubben 2004). Leaves are periodically removed from the lower part of the stems, usually from the time of ripening of the first fruit cluster and until the end of the season (Decognet et al. 2010). Infection by *B. cinerea* occurs when conidia deposit on wounded plant tissues. The development of stem cankers generally results in the death of the infected plant.

Due to the multinucleate state of its hyphal compartments and of its conidia (Büttner et al. 1994), *B. cinerea* exhibits a high-genetic variability with strains displaying very different degrees of aggressiveness on tomato plants (Decognet et al. 2009). It is also considered a high-risk pathogen in terms of resistance to fungicides (Leroux 2004). Several laboratory experiments have shown that this fungus can evolve rapidly under different selection pressure (Ajouz et al. 2010; Faretra and Pollastro 1993; Nicot et al. 1996). In a previous study, using an *in vitro* evolution experiment, we have selected mutants of *B. cinerea* differing in their level of resistance to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by various biological control agents (Ajouz et al. 2010). This resistance was associated with a high fitness cost for all the mutants that were examined, suggesting limited risk of complete loss of efficacy of pyrrolnitrin-producing biological control agents in the field (Ajouz et al. 2010). However, the stability of resistance observed in this study (Ajouz et al. 2010) may constitute a risk factor in the field, if subsequent mutations could improve the fitness of the resistant variants as already observed for fungicide-resistant *Aspergillus nidulans* isolates (Schoustra et al. 2006).

The infection of susceptible plants by *Botrytis* species is mediated by complex processes (Holz et al. 2004), essentially involving an extensive arsenal of pectinolytic enzymes that allow tissue invasion by the mycelium (Kars and Van Kan 2004; Shah et al. 2009; Staples and Mayer 1995). The extracellular enzymes and metabolites that mediate pathogenesis have been extensively studied on tomato (for review see Kars and Van Kan 2004), and histological observations have been achieved in various plant tissues, such as *Arabidopsis* (Van Baarlen et

al. 2007), onion leaves (Clark and Lorbeer 1976), grapes (Glidewell et al. 1997; Viret et al. 2004) and tomato fruits (Charles et al. 2008; Rijkenberg et al. 1980) and leaves (Prins et al. 2000). In contrast, little is known about cytohistological comparison of infection of tomato petioles stubs and stems by *B. cinerea* isolates differing in their level of aggressiveness.

The objective of this study was to compare the behaviour of two quasi-isogenic lines of *B. cinerea*, differing in their level of resistance to the antibiotic pyrrolnitrin, on artificially inoculated petioles and stems of tomato plants and in *in vitro* cultures. To test the hypothesis whether the reduction of sensitivity to pyrrolnitrin was correlated with reduced ability to invade plant tissues, the development of infection in tomato tissues was monitored in terms of lesion development and cytohistology. This knowledge is important to ensure the durability of efficacy of pyrrolnitrin-producing biological control agents against *B. cinerea*.

Material and methods

Botrytis cinerea isolates and inoculum production

The wild type parent isolate BC1 of *B. cinerea* (referred to as "BC1G0" in the rest of the paper) was obtained from an infected tomato plant in Plougastel (France) in 1989. This isolate was selected for its high level of aggressiveness on tomato plants (Decognet et al. 2009) and its sensitivity to pyrrolnitrin (Ajouz et al. 2010). In previous work, twenty successive-spore generations of this isolate were produced in Petri plates on Potato Dextrose Agar medium (PDA 39 g l⁻¹; Difco Laboratory, Detroit, Michigan) amended with the antibiotic pyrrolnitrin (Ajouz et al. 2010). This has resulted in the production of pyrrolnitrin-resistant mutants of BC1, one of which was selected for the present study and will be referred to as "BC1G20P" in the rest of the paper (Ajouz et al. 2010). These two quasi-isogenic lines have been maintained in stock cultures stored at -20°C in a 0.06 M, phosphate buffer (pH 4.5) containing 20% (V/V) glycerol.

Inoculum of BC1G0 and BC1G20P was produced in Petri plates on PDA medium incubated under cool white fluorescent light (14-hour photoperiod – 65 $\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in a growth chamber at 21°C. Conidia were collected in 5 ml of sterile distilled water from 14-day-old cultures. The suspensions were vortexed for 1 minute with 5 g of glass beads (2.5 mm diameter) to separate the spores and then filtered through 30 μm mesh filters to remove mycelial fragments. The final concentration of the suspensions was adjusted to 10⁶ conidia per ml using a hemacytometer.

In vitro fungal growth

For each line, BC1G0 and BC1G20P, the rate of spore germination was estimated on PDA medium in Petri plates. Spore germination was measured hourly for 6 hours and after 24 hours of incubation at 21°C by evaluating 100 arbitrarily-selected spores per plate. Three plates were inoculated and the values obtained from three different plates were averaged. The whole experiment was carried out three times independently. The rate of mycelial growth was determined on PDA medium in 90-mm Petri plates. Inoculation of *B. cinerea* was done in the center of the plate with a 5-mm diameter mycelial plug excised from three-day old non-sporulated cultures. The inoculated plates were incubated at 21°C with alternating periods of dark and light (10 hours -14 hours, respectively). The daily radial growth rate was measured in mm between 1 and 4 days after inoculation. Three replicated plates were used per line and the whole experiment was conducted independently three times. Statistical analysis was performed to compare the germination and the mycelial growth rate between BC1G0 and BC1G20P by *t*-test with Statistica Software.

Aggressiveness on tomato plants

The aggressiveness of the two quasi-isogenic lines of *B. cinerea*, BC1G0 and BC1G20P, was investigated on 6-8 week-old tomato plants cv. Monalbo (INRA, Avignon, France). Plants were grown in a greenhouse in individual pots containing a horticultural mix (De Baat, Coevorden, The Netherlands) and watered daily with a nutrient solution. Two types of bioassays were used with two independent sets of plants. A first type of bioassays was developed to compare the level of aggressiveness between BC1G0 and BC1G20P on the petioles of the tomato plants. To this end, three leaves were removed from each of three plants per *B. cinerea* line, leaving 50-mm petiole stubs on the stems. Each petiole was inoculated with 10 µl aliquots of a spore suspension containing 10⁶ conidia of *B. cinerea* per ml. Three non-inoculated plants were used as a control. The 50-mm petiole stubs were examined for infection and the length of each developing petiole lesion was monitored daily for 7 days after inoculation. The petiole infection was compared between the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P and the pyrrolnitrin-sensitive wild-type parent isolate BC1G0 at 1 and 2 days after inoculation. The results were expressed as percentages of infected petioles. The aggressiveness of BC1G20P was compared to that of BC1G0 by examining the kinetics of

development of lesions on the petiole stubs and by computing the area under the disease progress curve (AUDPC) between 1 and 5 days after inoculation (Decognet et al. 2009).

A second type of bioassays was realized to compare the level of aggressiveness between BC1G0 and BC1G20P on the stems of the tomato plants. To this end, three leaves were removed from each of three plants per line, leaving 5-10 mm petiole stubs on the stems. Each pruning wound was inoculated with 10 µl aliquots of a spore suspension containing 10⁶ conidia of *B. cinerea* per ml. Three non-inoculated plants were used as a control. The length of resulting stem lesions was monitored daily for 7 days after inoculation. The aggressiveness of BC1G20P was compared to that of BC1G0 by examining the kinetics of development of lesions on the stems. The kinetics of disease development on stems for BC1G0 and BC1G20P were assessed by computing the AUDPC between 1 and 7 days after inoculation (Decognet et al. 2009). In addition, detachment of petiole stubs from the stem was compared 3 days after inoculation between the BC1G20P inoculated plants and the non-inoculated plants.

All plants were incubated in a growth chamber with a photoperiod of 14 hours maintained at 21°C with a relative humidity above 90%. Three plants were inoculated for each *B. cinerea* line and three independent repetitions of the different bioassays were conducted.

The percentage of infected petioles and the values of AUDPC of BC1G20P were statistically compared with that of BC1G0 by *t* test, using the average values for each of the three assays as elementary replicates. Daily comparisons of lesion size between BC1G20P and BC1G0 were also realized by *t* test. Statistical analyses were done with Statistica software.

Cytohystology

Samples of petiole and stem fragments were excised from the region comprised between the healthy and the infected tissues of five tomato plants inoculated with either BC1G0 or BC1G20P on 5-10 mm petiole stubs as described above. Sampling was carried out 6, 12, 24, 48, 72 and 120 hours after inoculation. The samples were immersed for 12 hours at 4°C in a fixative solution (4% paraformaldehyde in 0.1 mM phosphate buffer, pH 7.2). Fixed specimens were dehydrated in a graded ethanol series (70-100%) and embedded in methacrylate resin (Technovit Kulzer 7100, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany). The specimens were oriented to obtain longitudinal sections. After resin polymerization at room temperature, the blocks were cut into 3-µm thick ribbons on an automatic retracting microtome (Supercut 2065; Reichert-Jung, Leica Instruments, Nussloch, Germany) equipped with disposable knives (Histoknife H; Heraeus-Kulzer). Sections were mounted on slides and

stained using periodic acid Schiff (PAS) procedure to visualize polysaccharides (pink) and naphthol blue black (NBB) to visualize proteins (dark blue) (El Maâtaoui and Pichot 1999). Observations were performed using a Leica DMR light microscope. Images were captured using a Leica DFC 300 FX digital camera and analysed using LAS software (Leica). At least three samples were observed for each stage. Attention has been paid to spore germination, mycelium structure and progression in petiole and stem tissues, and cytopathological effects.

Results

Aggressiveness on tomato plants

The aggressiveness of the pyrrolnitrin-sensitive wild-type parent isolate BC1G0 was compared with that of the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P on tomato plants based on the two types of bioassays. Tests realized on 50-mm petiole stubs revealed that petiole infection was significantly different between BC1G0 (77.8% of infected petiole) and BC1G20P (22.2% of infected petiole), one day after inoculation ($P = 0.03$), even if symptom developments were limited for both lines ($< 2\text{mm}$ of lesion, Fig. 1). Two days after inoculation, both *B. cinerea* quasi-isogenic lines were able to attack all the petiole stubs, and the size of lesions were not significantly different (Fig. 1, $P > 0.05$). Significant quantitative differences were observed between BC1G0 and BC1G20P for the subsequent development of petiole lesions (Fig. 1). After 5 days of incubation, the pyrrolnitrin-sensitive wild-type parent isolate BC1G0 reached almost the end of the 50-mm long petiole ($45.4 \pm 1.7\text{ mm}$) while BC1G20P invaded only $21.5 \pm 3.6\text{ mm}$ of the petiole (Fig. 1). Even 7 days after inoculation, the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P did not invade the entire petiole (Fig. 1). The general progression of infection in the 50-mm long petioles was significantly different between BC1G0 and BC1G20P (t test on AUDPC values, $P = 0.0068$).

The evaluation of aggressiveness on tomato stems revealed that the pyrrolnitrin-sensitive wild-type parent isolate BC1G0 readily colonized the 5-10 mm petiole stub and infected the stem, while lesion development was very limited for BC1G20P (Fig. 2). The general progression of infection on the stems was significantly different between BC1G0 and BC1G20P (t test on AUDPC values, $P < 0.0001$). Most of the time, the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P failed to attack the stems and caused a brown discoloration of the stem tissue at the leaf-abscission zone, compared with the control non-inoculated plants (Fig. 3).

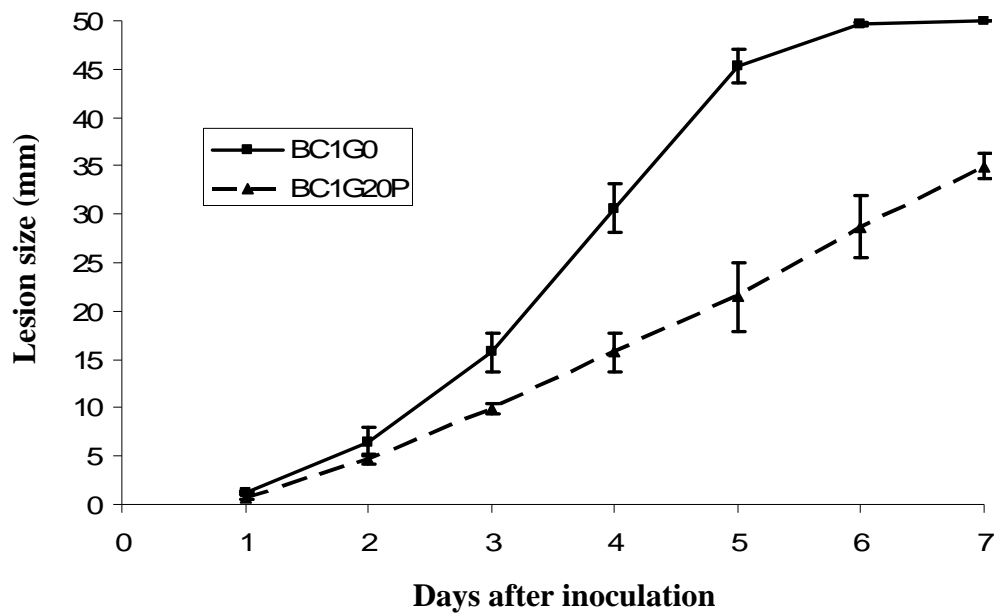


Fig. 1 Kinetics of lesion development on 50-mm long tomato petioles inoculated with either the pyrrolnitrin-sensitive wild-type parent isolate BC1G0 or the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P of *Botrytis cinerea*. No differences are observed during the first two days after inoculation. From the third day and until the end of the experiment, the lesions induced by BC1G0 are significantly longer than those induced by BC1G20P. Each point represents the mean of three independent repetitions. Bars indicate standard deviation of the mean of the three repetitions.

For this mutant, the size of the stem lesions rarely increased beyond the diameter of the petiole (Fig. 3). In addition, inoculation with BC1G20P significantly affected the detachment of the petiole stubs from the tomato stem (24.4% of detachment, 3 days after inoculation), while the petioles did not detach from the stem for the control non-inoculated plants (Fig. 3).

Cytohystology

Sections from petiole fragments fixed 6 hours after inoculation revealed that spores of BC1G0 and BC1G20P germinated within the cut cells of petiole tissues (Fig. 4a ,b). The germinated spores formed thin germ tubes which initiated the penetration of the cells and the intercellular spaces particularly in cortical and medullar parenchyma (Fig. 4c, d). Observations of sections performed 12, 24, and 48 hours after inoculation showed different degrees of mycelium proliferation and colonization of petiole tissues with no obvious differences between BC1G0 and BC1G20P. Twelve hours after inoculation, hyphae began to extend to inner tissues where they developed intra and intercellularly (Fig. 4c, d). Sections carried out from petioles 24 hours after inoculation showed mycelial development for both BC1G0 and BC1G20P (Fig. 4e, f). At this stage of infection, hyphae have been observed colonizing all tissues where the cell wall broke down and cell collapse took place (Fig. 4e, f). Forty-eight hours after inoculation, the infection progressed deeply in petiole tissues with intensive cell wall lyses and cell death (Fig. 5a, b). At these early stages of infection, BC1G0 and BC1G20P exhibited similar capacities for tissue invasion and cytopathological alterations. However, 72 hours after inoculation evident differences appeared. Indeed, at a structural level, it was obvious that the mycelium compartments of BC1G20P were shorter than the mycelium compartments of the parent isolate BC1G0 (Fig. 5c, d). Moreover, the mycelium compartments of BC1G20P exhibited important glycogen accumulations as attested by the presence of voluminous, PAS-positive granules in the cytoplasm, compared to BC1G0 (Fig. 5e, f). It was also noted that cells of BC1G20P hyphae presented spherical shapes and separated from each other *via* septum disintegration thus producing chlamyospore-like structures (Fig. 5c, e). Another difference was observed concerning hyphal structure, particularly in tip compartments. For BC1G0 they were normally shaped with rigid walls and pointed apices, while for BC1G20P they appeared shrunken with undulating walls and rounded apices (Fig. 6a, b). The BC1G0-inoculated samples displayed generalized invasion by the mycelium.

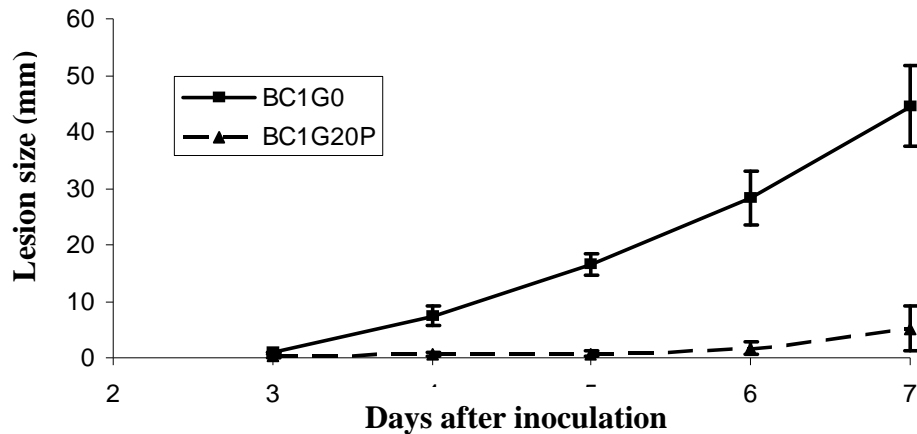


Fig. 2 Kinetics of stem lesion expansion on tomato plants inoculated with either the pyrrolnitrin-sensitive wild-type parent isolate BC1G0 or the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P of *Botrytis cinerea*. Differences of lesion size between BC1G0 and BC1G20P become evident from the fourth day and increase until the end of the experiment. Each point represents the mean of three independent repetitions. Bars indicate standard deviation of the mean of the three repetitions.

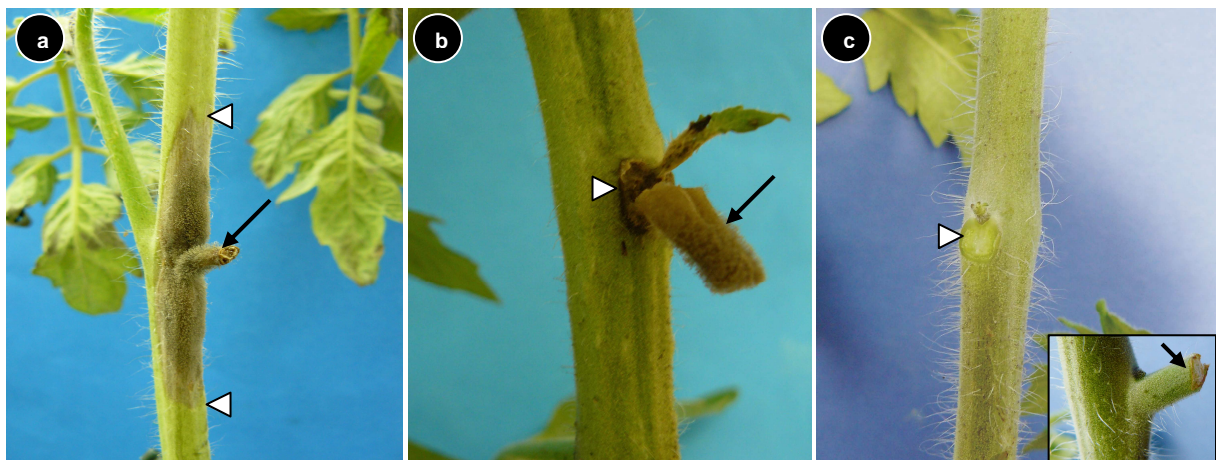


Fig. 3 Symptoms induced by the pyrrolnitrin-sensitive wild-type parent isolate BC1G0 and the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P of *Botrytis cinerea* on petiole stubs and stems of tomato plants after 7 days of infection. BC1G0 invades the petiole stub (a, ➔) and extends to the stem where it generates a large lesion (a, ▷). BC1G20P initiates infection of petiole stub that detaches from the stem (b, ➔). Around the leaf-abscission zone, the stem exhibits browning tissues (b, ▷). In the case of the control non-inoculated plants, the petiole does not separate from the stem (c, inset, ➔), and when the petiole is removed, the stem is not coloured in this area (c, ▷).

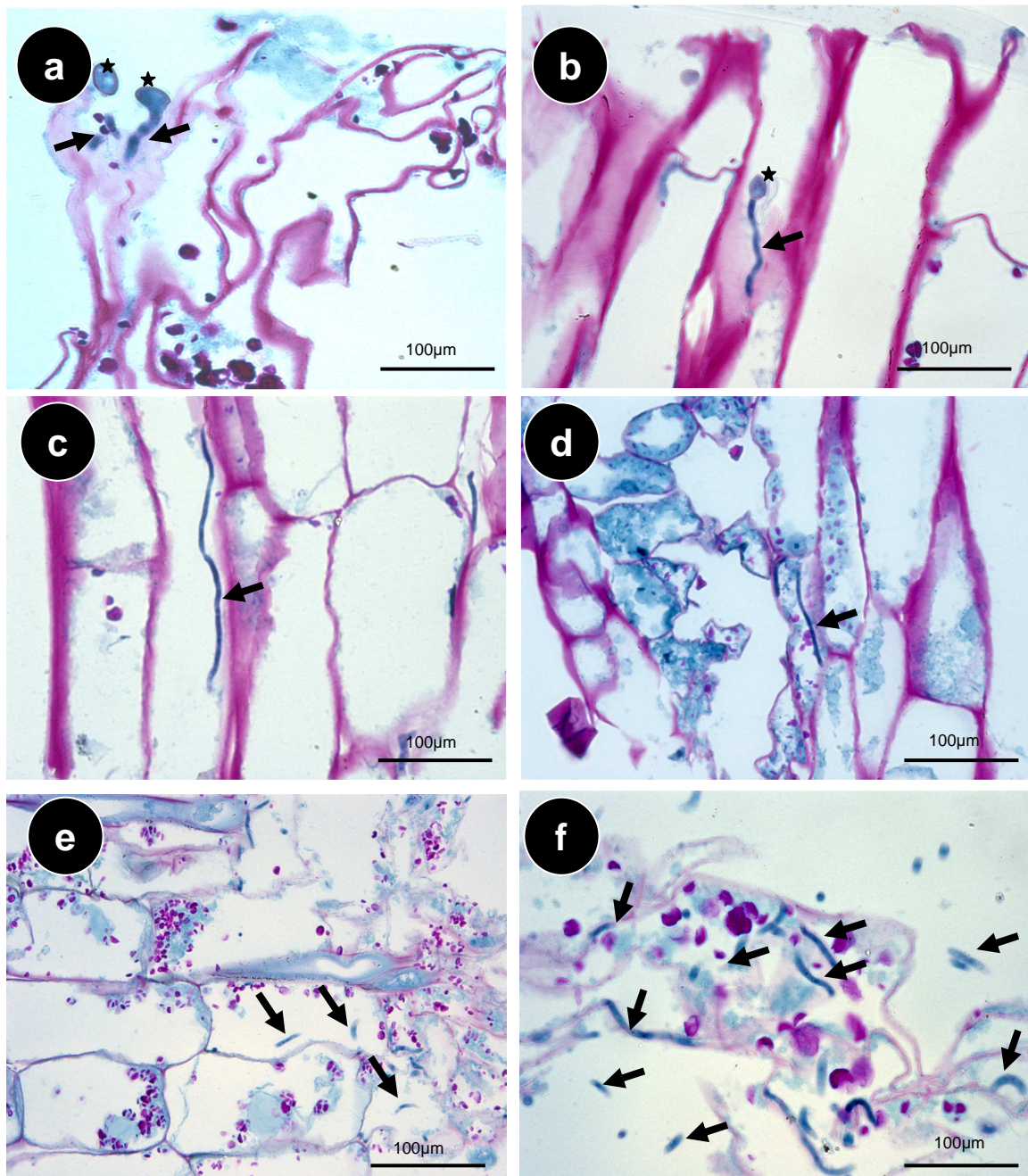


Fig. 4 Cytohistological aspects of tomato petioles infected by the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P (a, c, e) and its pyrrolnitrin-sensitive parental wild-type isolate BC1G0 (b, d, f) of *Botrytis cinerea*. Petiole fragments were sectioned 6 hours (a, b), 12 hours (c, d) and 24 hours (e, f) after inoculation. (a, b) Six hours after inoculation, spore germination (★) takes place for both isolates within the injured cells and forms germ-tubes that penetrate peripheral tissues (➔). (c, d) After 12 hours, mycelium development gains profound petiole tissues (➔). (e, f) Plant cell alterations appear after 24 hours with BC1G0 and BC1G20P: they consist of cell wall breakdown and cell collapses due to the intensive mycelium proliferation (➔).

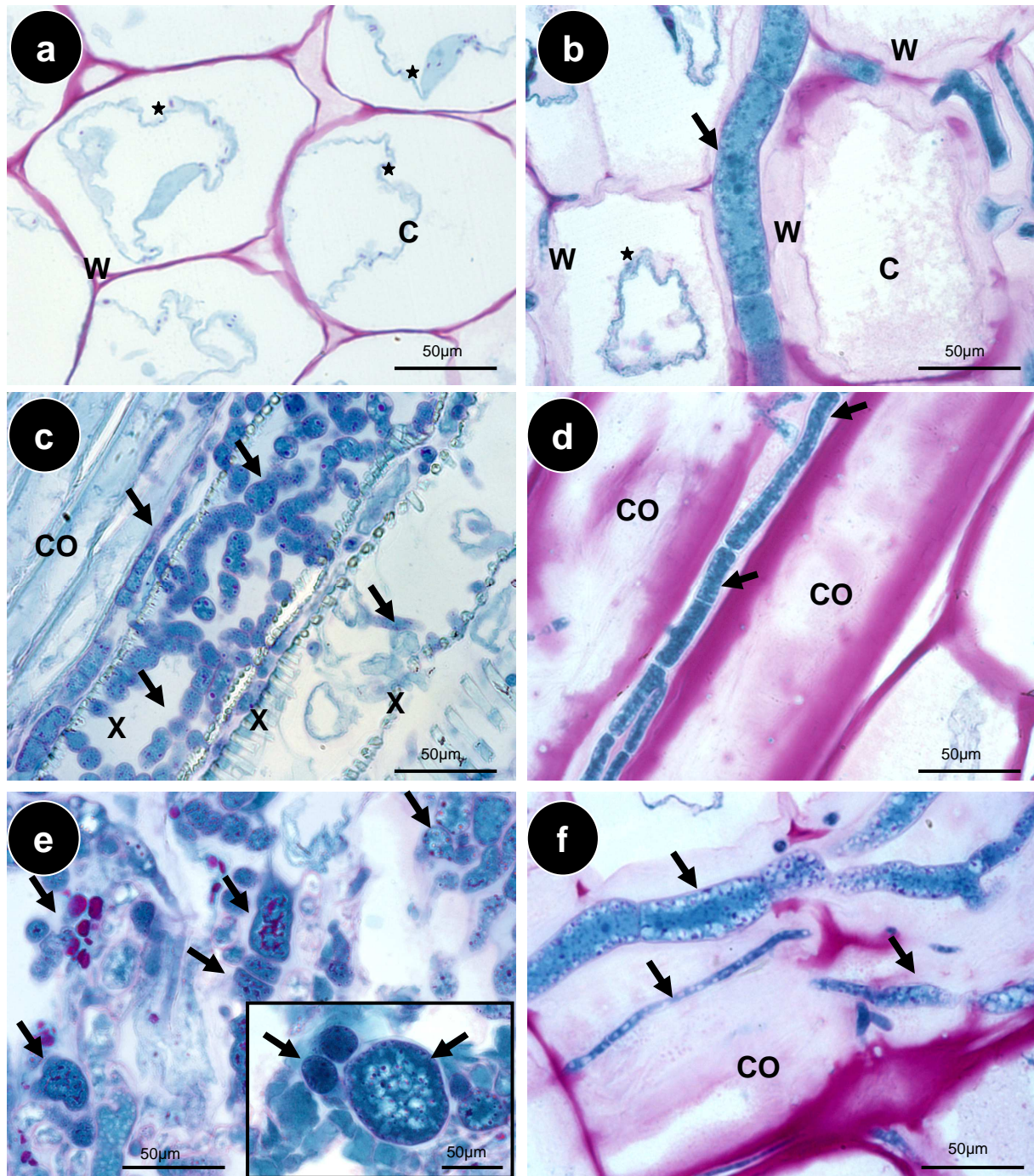


Fig. 5 Cytohistology of petiole tissues with the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P of *Botrytis cinerea* (a) compared to its pyrrolnitrin-sensitive parental wild-type isolate BC1G0 (b), and mycelial structures of BC1G20P (c, e) and BC1G0 (d, f). (a, b) Cell wall lyses and cell death are observed for both lines 48 hours after inoculation (★). (c, d, e, f) 72 hours after inoculation, the hyphae of BC1G20P displays short mycelial cells (c, ►) compared to BC1G0 hyphae (d, ►) and contains voluminous glycogen granules coloured in pink (e) compared to BC1G0 (f). In many places, BC1G20P mycelial compartments separate from each other yielding individual chlamydsopore-like structures (e, inset). C: cytoplasm; CO: collenchyma cells; W: cell wall; X: xylem.

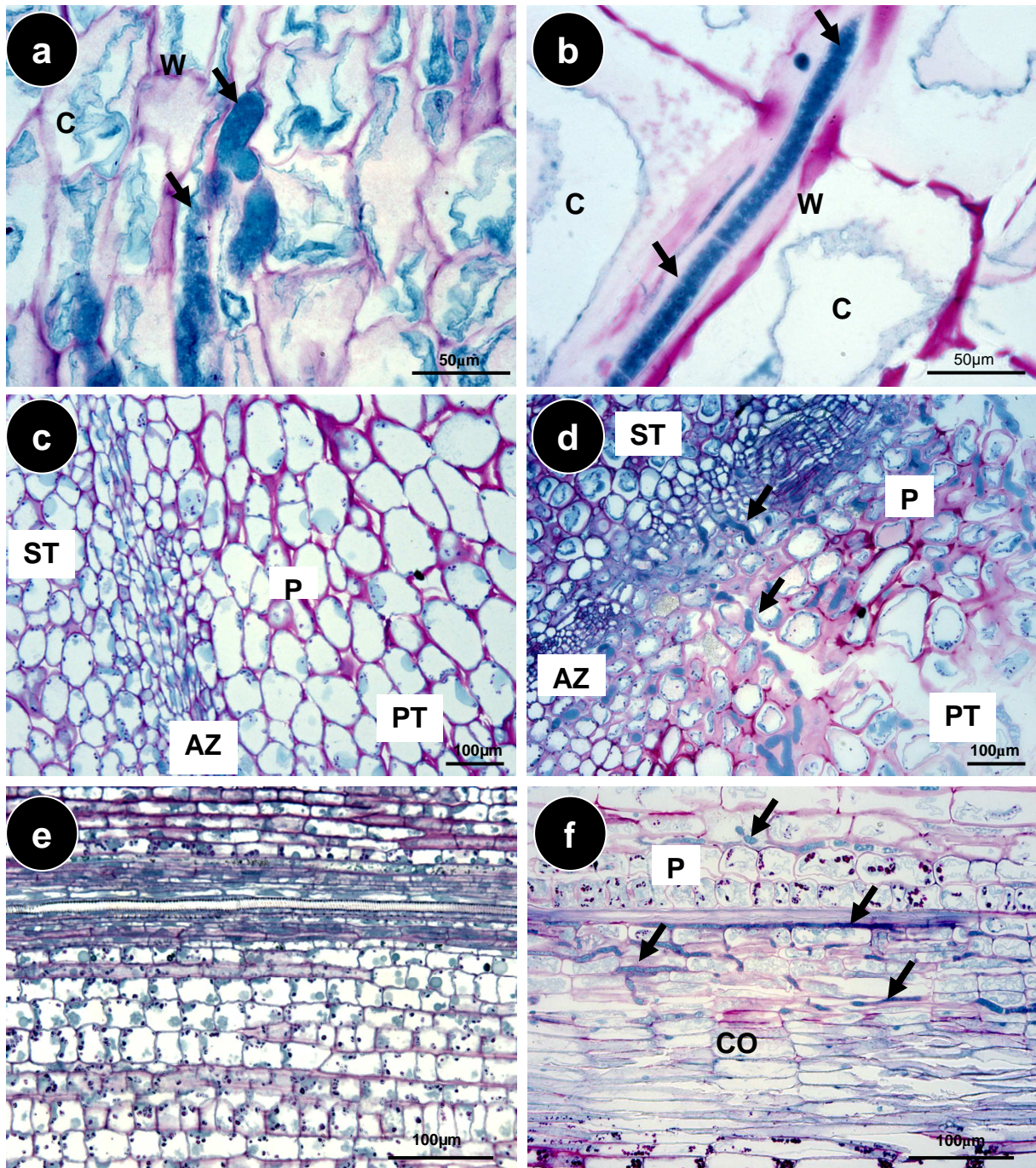


Fig. 6 Mycelium structure of the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P of *Botrytis cinerea* (a) and its pyrrolnitrin-sensitive parental wild-type isolate BC1G0 (b), and cytohistology of tomato stems with BC1G20P (c, e) and BC1G0 (d, f). (a, b) Micrographs showing hyphal apices in petiole parenchyma, 72 hours after inoculation. Note the destructured appearance of the mutant tips (a, ➤) that contrasts with the healthy morphology of wild-type (b, ➤). (c, d) Sections from the junction between petioles and stems showing the leaf-abscission zone, 72 hours after inoculation. The abscission zone of plants inoculated with the mutant is mycelium free (c) whereas wild-type mycelium induces disintegration of abscission zone cells and extends to stem tissues (d, ➤). (e, f) Healthy and completely invaded stem tissues from tomato plants inoculated with BC1G20P and BC1G0 5 days after inoculation. AZ: leaf abscission zone; C: cytoplasm; CO: collenchyma; P: parenchyma; PT: petiole tissues; ST: stem tissues; W: cell wall.

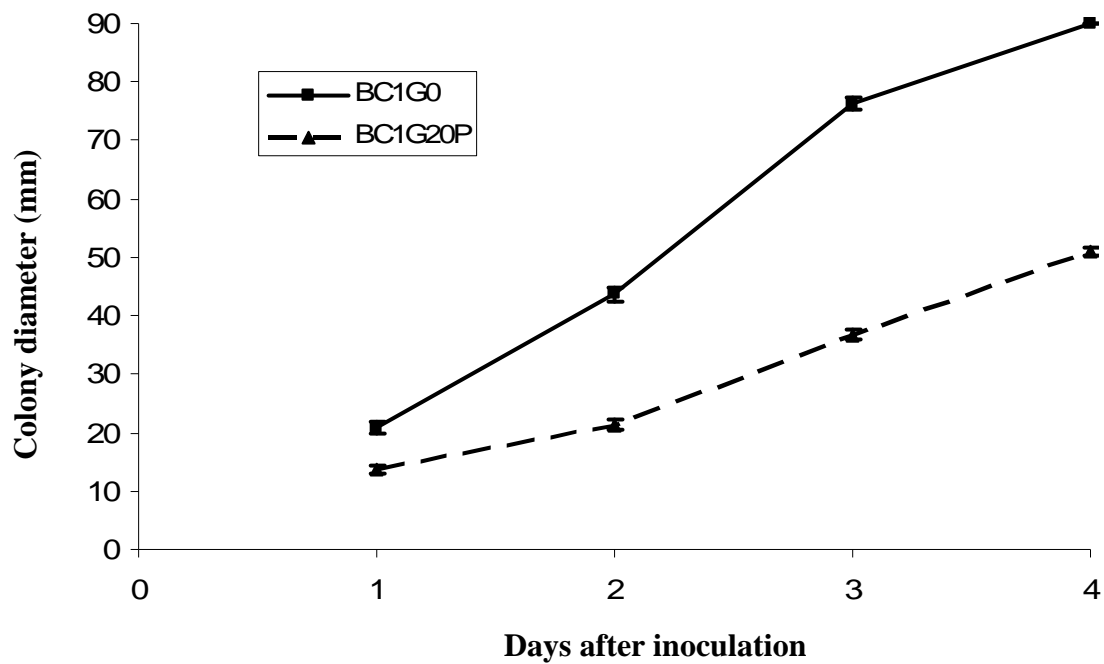


Fig. 7 Kinetics of *in vitro* mycelial growth of the *Botrytis cinerea* pyrrolnitrin-sensitive wild-type parent isolate BC1G0 and the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P on PDA medium. Differences in mycelial growth between BC1G0 and BC1G20P are observed throughout the experiment duration. Each point represents the mean of three independent repetitions. Bars indicate standard deviation of the mean of the three repetitions.

In addition, many hyphae reached the leaf-abscission zone where they created breaches from which they initiated the invasion of stem tissues (Fig. 6d). In contrast, the mycelium of BC1G20P was absent from this zone (Fig. 6c). Sections performed 120 hours after inoculation showed that the mycelium of BC1G20P was confined to the peripheral tissues of the petiole, with no stem infection whereas BC1G0 mycelium was extended and invaded all stem tissues (Fig. 6e, f). Particularly damaged plant structures were parenchyma and collenchyma tissues (Fig. 6f).

Spore germination and mycelial growth

The hourly spore germination rate measured between 3 and 5 hours on PDA medium showed no significant differences between BC1G0 and BC1G20P (21.6 ± 6.6 % of germinated spores per hour and 21.3 ± 4.8 % of germinated spores per hour respectively, $P > 0.05$). Moreover, spores from BC1G0 and BC1G20P were equally fully germinated 24 hours after inoculation. In contrast, significant differences for mycelial growth on PDA medium were observed between BC1G0 and BC1G20P ($P < 0.0001$ at 3 days after inoculation, Fig. 7). The development of BC1G20P was reduced compared to that of the pyrrolnitrin-sensitive wild-type parent isolate BC1G0. While the colony of BC1G0 reached the edge of the 90-mm diameter Petri plate after 4 days of incubation, the colony of the BC1G20P pyrrolnitrin-resistant mutant only measured 51 ± 0.6 mm (Fig. 7).

Discussion

The reduction of sensitivity to pyrrolnitrin in *B. cinerea* was associated with a reduced ability to invade tomato plant tissues. Differences of aggressiveness between the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P and its sensitive wild-type parent isolate BC1G0 have been observed in both petioles and stems of tomato plants. The observed differences were not related to the early stages of infection as the conidia of BC1G0 and BC1G20P germinated as early as 6 hours after inoculation and the germ-tubes proliferated and colonized the petiole tissues. These differences may be linked to the observed reduced mycelial growth rate of the mutant compared to the wild type parent. This difference in mycelial growth is in accordance with results of a previous study which showed that mutants of *B. cinerea* resistant to fludioxonil, a synthetic analogue of pyrrolnitrin, displayed significant reduction in mycelial growth compared to their fludioxonil-sensitive wild type parental isolates (Ziogas et al. 2005).

A more recent study reported that all tested mutants of *Penicillium expansum* with high resistance to fludioxonil grew significantly slower on PDA at 20°C compared with the wild-type parental isolates (Li and Xiao 2008).

To test whether the observed reduction of BC1G20P aggressiveness was correlated to reduced ability to invade plant tissues, we performed histological studies in light microscopy by periodic sectioning of inoculated samples. It appeared that even if up to 72 hours, BC1G0 and BC1G20P were able to form mycelium within tomato petiole tissues, the pyrrolnitrin-resistant mutant generally failed to extend further to the stem tissues. This mutant frequently failed to reach and cross the leaf-abscission zone whereas its progression was linear in the petiole stub during the course of the experiment. This suggests that possible plant defence mechanisms in the petiole stub failed to hinder the development of both strains, but that those deployed at the level of the leaf-abscission zone were sufficient to block the slow growing mutant. One could further hypothesize that the delay in reaching the leaf-abscission zone, compared to the fast growing parental strain, may have provided needed reaction time for the defence mechanisms to be fully effective. This hypothesis is supported by the fact that the leaf-abscission zone of BC1G20P-inoculated plants became discoloured in spite of the absence of detected mycelium, suggesting the release and accumulation of secondary plant metabolites with likely antimicrobial activity. Previous studies have reported the development of physical and chemical barriers against *B. cinerea* at the penetration site as a result of the simultaneous formation of structural barriers through the incorporation of phenolic compounds and the production of phytoalexins (Van Baarlen et al. 2004). In addition, the absence of mycelium in the stem in the case of the slow growing BC1G20P may be due to the limited induction of reactive oxygen intermediates involved in the hypersensitive reaction in the plant. Indeed, reactive oxygen intermediates were found at higher levels on bean leaves infected with aggressive isolates of *B. cinerea* when compared to less aggressive isolates (Von Tiedemann 1997). For aggressive isolates, the accumulation of reactive oxygen intermediates facilitates *B. cinerea* invasion and may in fact be essential for successful infection (Govrin and Levine 2000). In the case of a weakly aggressive isolate, such as BC1G20P, incorporation of phenolic compounds, production of phytoalexins and limited induction of reactive oxygen intermediates may explain the absence of mycelium development in the tomato stem tissues. Further work should be done to test these hypotheses.

The performed *in planta* cytohistological investigations of infection revealed important differences concerning the structure of mycelial compartment and the morphology of hyphal apices between BC1G0 and BC1G20P. While the pyrrolnitrin-sensitive wild-type parent

isolate BC1G0 has a pointed apex, the BC1G20P mutant has a rounded one. In addition, production of chlamydo-spores-like structures was observed for the pyrrolnitrin-resistant mutant BC1G20P. The chlamydo-spores-like structures were formed by transformation of mycelium cells and by hyphal disintegration. This phenomenon of structural change has been noticed for fungi cultured in stressful conditions. Harish et al. (1998) reported that *in vitro* interaction in liquid medium between *Fusarium udum* and the biocontrol strain AF1 of *Bacillus subtilis* lead to the production of chlamydo-spore-like structures and to an increased vacuolisation in the plant pathogen. In contrast, these authors noted that if *B. subtilis* was inoculated 24 h after *F. udum* (i.e. conditions less stressful for the pathogen), chlamydo-spore-like structures were not formed and regular conidiation was observed (Harish et al. 1998). Rijkenberg et al. (1980) showed that on tomato fruit, unsuccessful penetration of *B. cinerea* was often associated with a differentiation of germ tubes into chlamydo-spores at the point of attachment to epidermis. Holz et al. (2004) also reported that on fruit of nectarine, plum and pear, mycelium of *B. cinerea* formed chlamydo-spores when the fruits were subjected to stressful conditions, such as intermittent dry periods or long periods at low temperature (48 hours at 5°C). Similarly, in our experimental conditions, the plant may apply significant stress on the slow-growing mutant BC1G20P and stimulate the production of chlamydo-spore-like structures. This hypothesis is reinforced by the fact that these differences in mycelial structure were not observed in *in vitro* culture on PDA medium (data not shown). These differences in mycelial structure may emphasize the difference in mycelial growth between BC1G0 and BC1G20P in tomato tissues.

Together, these results suggest that the acquisition of pyrrolnitrin-resistance in *B. cinerea* is accompanied by noticeable losses of aggressiveness on tomato plants. In practical terms, the development of resistance to pyrrolnitrin in *B. cinerea* should not have consequences on the efficacy of pyrrolnitrin-producing biological control agent. However, the present study indicates that the mutant resistant to pyrrolnitrin is able to develop and sporulate on the tomato petiole stub (Figure 3). During the growing season of tomato culture, this spore production may enable the mutant to accomplish several cycles of infection-sporulation-dissemination on susceptible host tissues. An interesting question arising from this study would be whether the multiplication on the plant during several generations allows this pyrrolnitrin-resistant mutant to evolve towards greater aggressiveness.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Claire Troulet and Gisèle Riqueau for excellent technical assistance in the plant tests. They also acknowledge Isabelle Bornard for the additional microscopical observations of the mycelial structure done *in vitro* and Veronique Decognet for critically reading the manuscript.

References

- Ajouz, S., Bardin, M., & Nicot, P. C. (2010). Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. *Plant Pathology (in press)*
- Blakeman, J. P. & Fokkema, N. J. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 20, 167-192
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B., & Tudzynski, P. (1994). Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics*, 25, 445-450
- Charles, M. T., Benhamou, N., & Arul, J. (2008). Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit - III. Ultrastructural modifications and their impact on fungal colonization. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 27-40
- Clark, C. A. & Lorbeer, J. W. (1976). Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *Botrytis cinerea* on onion leaves. *Phytopathology*, 66, 1279-1289.
- Decognet, V., Bardin, M., Trottin-Caudal, Y., & Nicot, P. C. (2009). Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathology*, 99, 185-193
- Decognet, V., Ravetti, F., Martin, C., & Nicot, P. C. (2010). Improved leaf pruning reduces development of stem cankers caused by grey mould in greenhouse tomatoes. *Agronomy and Sustainable Development (in press)*
- Dik, A. J. & Wubben, J. P. (2004). Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 319-333). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- El Maâtaoui, M. & Pichot, C. (1999). Nuclear and cell fusion cause polyploidy in the megagametophyte of common cypress, *Cupressus sempervirens* L. *Planta*, 208, 345-351

- Elad, Y. & Stewart, A. (2004). Microbial control of *Botrytis* spp. In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delan (Eds.), *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 223–241). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Faretra, F. & Pollastro, S. (1993). Isolation, characterization, and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to the phenylpyrrole fungicide CGA 173506. *Mycological Research*, 97, 620-624
- Glidewell, S. M., Williamson, B., Goodman, B. A., Chudek, J. A., & Hunter, G. (1997). An NMR microscopic study of grape (*Vitis vinifera* L.). *Protoplasma*, 198, 27-35
- Govrin, E. M. & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10, 751-757
- Harish, S., Manjula, K., & Podile, A. R. (1998). *Fusarium udum* is resistant to the mycolytic activity of a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1. *FEMS Microbiology Ecology*, 25, 385-390
- Holz, G., Coertze, S., & Williamson, B. (2004). The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 9-27). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Kars, I. & Van Kan, J. A. L. (2004). Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 99-118). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Leroux, P. (2004). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 195-222). The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Li, H. X. & Xiao, C. L. (2008). Characterization of fludioxonil-resistant and pyrimethanil-resistant phenotypes of *Penicillium expansum* from apple. *Phytopathology*, 98, 427-435
- Nicot, P. C., Mermier, M., Vaissiere, B. E., & Lagier, J. (1996). Differential spore production by *Botrytis cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light-absorbing polyethylene film. *Plant Disease*, 80, 555-558
- Prins, T. W., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., Ten Have, A., Hansen, M. E., Tenberge, K., & Van Kan, J. A. L. (2000). Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In: J. W. Kronstad (Eds.), *Fungal Pathology* (pp. 33-64). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.

- Rijkenberg, F. H. J., De Leeuw, G. T. N., & Verhoeff, K. (1980). Light and electron microscopy studies on the infection of tomato fruits by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany*, 58, 1394-1404
- Rosslénbroich, H. J. & Stuebler, D. (2000). *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19, 557-561
- Schoustra, S. E., Debets, A. J. M., Slakhorst, M., & Hoekstra, R. F. (2006). Reducing the cost of resistance; experimental evolution in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 1115-1127
- Shah, P., Gutierrez-Sanchez, G., Orlando, R., & Bergmann, C. (2009). A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. *Proteomics*, 9, 3126-3135
- Staples, R. & Mayer, A. (1995). Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 134, 1-7
- Van Baarlen, P., Legendre, L., & Van Kan, J. A. L. (2004). Plant defence compounds against *Botrytis* infection. In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 143-161). The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Van Baarlen, P., Woltering, E. J., Staats, M., & Van Kan, J. A. L. (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology*, 8, 41-54
- Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V. G., & Cole, F. M. (2004). *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology*, 94, 850-857
- Von Tiedemann, A. (1997). Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50, 151-166
- Ziogas, B. N., Markoglou, A. N., & Spyropoulou, V. (2005). Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *European Journal of Plant Pathology*, 113, 83-100

Chapitre V

Comparaison du déterminisme génétique de la résistance de *Botrytis cinerea* à la pyrrolnitrine et à l'iprodione.

Publication 4

Comparison of resistance mechanisms to pyrrolnitrin and to iprodione in *Botrytis cinerea*.

S. Ajouz, S. Fillinger, A. S. Walker, P. Leroux, P. C. Nicot and M. Bardin

(à soumettre à *Fungal Genetics and Biology*)

Comparison of resistance mechanisms to pyrrolnitrin and to iprodione in *Botrytis cinerea*

S. AJOUZ¹, S. FILLINGER², A. S. WALKER², P. LEROUX², P.C. NICOT¹, and M. BARDIN^{1,*}

¹ INRA, UR407, Plant Pathology Unit, Domaine St Maurice, F-84140 Montfavet, France

² INRA UMR 1290, Bioger-CPP, BP01, F-78850 Thiverval-Grignon, France.

* Corresponding author. Mailing address: INRA, UR407, Unité de Pathologie Végétale, Domaine St Maurice, F-84140 Montfavet, France. Phone: 33-432-72-28-55. Fax: 33-432-72-28-41. E-mail: marc.bardin@avignon.inra.fr

Abstract

Previously, we reported the development of resistance to pyrrolnitrin in laboratory-induced mutants of *B. cinerea*, suggesting a possible loss of efficacy of pyrrolnitrin-producing biological control agents. Pyrrolnitrin is a structural analogue of phenylpyrrole fungicides and it was shown that highly-resistant mutants to phenylpyrroles generally acquire resistance to iprodione, a dicarboximide fungicide. In the present study we compared the mechanisms of resistance to pyrrolnitrin and to iprodione in *B. cinerea*. This knowledge may be helpful to predict the risk related to the loss of efficacy of pyrrolnitrin-producing biological control agents against *B. cinerea* in the field. Pyrrolnitrin-induced mutants and iprodione-induced mutants of *Botrytis cinerea* were produced *in vitro* on media containing pyrrolnitrin or iprodione. For the pyrrolnitrin-induced mutants, high level of resistance to pyrrolnitrin was associated with a high level of resistance to iprodione, for the four tested isolates. For the iprodione-induced mutants, the high level of resistance to iprodione detected generated variable levels of resistance to pyrrolnitrin, for the five tested isolates. All selected mutants showed hypersensitivity to high osmolarity suggesting a defect in the osmosensing signal transduction pathway. The sequences of the osmosensing class III histidine kinase encoding gene *bos1* showed different mutations in both types of mutants. However, resistances to pyrrolnitrin and iprodione were not systematically associated with a point mutation in the *Bos1* gene. The present study provides evidence that fungicide pressure exerted on a fungal plant pathogen is able to build-up resistance to an antibiotic produced by a biological control agent. It also revealed that despite the fact that pyrrolnitrin and iprodione exhibited a similar antifungal spectrum, their mode of action may not be totally similar.

Keywords: experimental evolution, fitness, histidine kinase, cross-resistance, point mutation, osmotic stress

Introduction

Gray mould, caused by the fungus *Botrytis cinerea* Pers.:Fr (teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), is a severe disease on a wide range of crops with economic importance (Jarvis, 1977). Chemical control is the main method used to reduce the incidence of this pathogen in most crops. Isolates of *B. cinerea* resistant to several fungicides have been detected in many countries worldwide (Leroux, 2004; Myresiotis et al., 2007). Biological control could be an alternative or a complement to chemical control because the development of resistance of plant pathogens to biological control agents is supposed to develop less frequently as compared to chemical control methods (Duffy et al., 2003). Many biological control agents effective against *B. cinerea* have been described in the past years (Elad and Stewart, 2004; Elmer and Reglinski, 2006) and several of them produce antibiotics (Raaijmakers et al., 2002).

Pyrrolnitrin [3-chloro-4-(3-chloro-2-nitrophenyl) pyrrole], a structural analogue of the fungicide fludioxonil, is an antibiotic with a broad-spectral antifungal activity (Raaijmakers et al., 2002) that was first isolated from *Burkholderia pyrrocina* (Arima et al., 1964). It was later found in several bacterial species (Hammer et al., 1999), some of them having been implicated in the biological control of fungal plant pathogens (Raaijmakers et al., 2002), and several of them have proved to inhibit growth of *B. cinerea* (Chernin et al., 1996; Janisiewicz and Roitman, 1988). Resistance of *B. cinerea* to pyrrolnitrin has recently been reported in laboratory-induced mutants, suggesting a possible loss of efficacy of pyrrolnitrin-producing biological control agents (Ajouz et al., 2010). Moreover, resistance to fludioxonil, a phenylpyrrole fungicide derivative from the antibiotic pyrrolnitrin, has been reported in laboratory-induced mutants (Leroux et al., 1999; Okada et al., 2005; Ziogas et al., 2005), and in one sole field isolate collected after several years of monitoring in France (Vignutelli et al., 2002).

The mechanism of resistance to phenylpyrroles has been extensively studied in *B. cinerea* (Faretra and Pollastro, 1993; Leroux et al., 2002; Liu et al., 2008; Okada et al., 2005; Ziogas et al., 2005). These studies revealed that highly-resistant mutants to phenylpyrroles generally acquire resistance to dicarboximides and to aromatic hydrocarbons, and that they are sensitive to osmotic stress (Leroux et al., 1999; Ziogas et al., 2005). In *B. cinerea*, molecular studies revealed that an osmosensing histidine kinase mediates resistance to these fungicides (Cui et al., 2004; Cui et al., 2002; Liu et al., 2008; Oshima et al., 2002) and to aromatic hydrocarbons. It is also devoted to adaptation to adverse environmental conditions such as

Table 1 Characteristics, level of aggressiveness on tomato plants and on apple fruits, sensitivity to pyrrolnitrin and fungicides of *Botrytis cinerea* isolates used for the *in vitro* conidial-transfer experiments.

Isolate of <i>Botrytis cinerea</i>	Host	Year isolated	Aggressiveness ^a		Pyrrolnitrin ^b	Fungicide sensitivity Phenotype ^c
			tomato plant	apple		
BC1	tomato	1989	+++	+++	S	BenS - ImiR1
BC21	strawberry	1991	++	+++	S	BenS - ImiS
BC25	tomato	1991	-	++	S	BenS - ImiS
BC26	tomato	1991	+	++	S	BenS - ImiR1
H6	tomato	1991	-	+	S	BenR1 - ImiS

^a +++ = high level of aggressiveness, ++ = moderate level of aggressiveness, + = low level of aggressiveness, - = not aggressive according to Ajouz et al. (2010)

^b Discriminatory concentration for pyrrolnitrin 0.05 µg ml⁻¹; S = sensitive and R = resistant.

^c phenotype defined according to Leroux et al. (1999).

osmotic and oxidative stress and to pathogenesis (Liu et al., 2008; Viaud et al., 2006). The role of this histidine kinase in resistance to dicarboximides and phenylpyrroles has also been demonstrated in other fungal species (Avenot et al., 2005; Dry et al., 2004; Kanetis et al., 2008; Ma et al., 2006; Nathues et al., 2007; Okada et al., 2005; Orth et al., 1995; Pillonel and Meyer, 1997).

The objective of this study was to compare the mechanisms of resistance to pyrrolnitrin and to iprodione in *B. cinerea*. In order to clarify the difference in the antifungal mechanisms between pyrrolnitrin and dicarboximides fungicides, pyrrolnitrin-induced mutants and iprodione-induced mutants were independently produced. The cross-resistance between pyrrolnitrin and iprodione and with other anti-*Botrytis* fungicides was investigated. This knowledge may be helpful to assist in predicting the risk related to the build-up of field resistance to pyrrolnitrin and consequently to the loss of efficacy of pyrrolnitrin-producing biological control agents in *B. cinerea*. To expand our knowledge on the molecular basis of resistance in *B. cinerea*, the sequence comparisons of the histidine kinase encoding gene *bos1* from the pyrrolnitrin-induced mutants and the iprodione-induced mutants have been investigated. Different point mutations in that gene have been observed in several of the mutants produced. New mutations, not yet identified in previous studies, were detected.

Material and methods

Fungal isolates, culture conditions and mutant selection

Five single-spore isolates of *B. cinerea* originating from France were selected from a collection maintained in our laboratory. These isolates had three different phenotypes of resistance to fungicides (Table 1). These phenotypes were defined based on the pattern of sensitivity to 13 fungicides representing 10 chemical groups as described by Leroux et al (1999). Isolates had also different levels of aggressiveness on tomato plants and apple fruits (Table 1). All selected isolates were sensitive to pyrrolnitrin (Table 1). During this work, they were maintained in stock cultures stored at -20°C in a 0.06 M phosphate buffer containing 20% (V/V) of glycerol. For DNA isolation, 10⁷ spores were harvested and used to inoculate 100 ml liquid yeast-sugar-salt medium (YSS, 2g L⁻¹ of yeast extract, 10g L⁻¹ of glucose, 2g L⁻¹ of KH₂PO₄, 1.5g L⁻¹ of K₂HPO₄, 1g L⁻¹ of (NH₄)₂SO₄, 0.5g L⁻¹ of MgSO₄ 7H₂O) and grown for 16 hours at 23°C with 150 rpm shaking.

***In vitro* conidial-transfer experiment**

Successive selections on pyrrolnitrin or iprodione were carried out to produce 20 consecutive generations of spores on Potato Dextrose Agar medium (PDA 39 g L⁻¹; Difco Laboratory) amended with pyrrolnitrin (purified microbial pyrrolnitrin >95%, Sigma chemical) or iprodione (BASF Agro SAS). Pyrrolnitrin was dissolved in methanol at the concentration of 1 mg mL⁻¹ and conserved at 4°C in the dark to preserve its activity. Iprodione (pure technical grade) was dissolved in acetone at the concentration of 25 mg mL⁻¹ and conserved at 4°C

For each the generation, 40 µL of a conidial suspension dosed at 10⁶ spores per mL were spread on Petri dishes containing PDA medium amended with pyrrolnitrin or iprodione. The 20 generations produced on pyrrolnitrin were performed with four *B. cinerea* isolates (Table 1) as previously described (Ajouz et al., 2010). Generations produced on iprodione were performed following the same procedure with the 5 isolates listed in Table 1 and slightly modified as follows: from G0, ten successive generations (G1 to G10) were produced on PDA medium in the presence of 5 mg L⁻¹ iprodione. Spores from all of the generations (G1 to G10) were preserved at -20°C for further work. Using the spores of generation G10, ten additional successive generations were produced with increasing selection pressure. The iprodione concentration was progressively increased from 5 mg L⁻¹ (for the production of the first ten generations) to 200 mg L⁻¹ for the production of generation G20. For each generation, plates were incubated for 14 days at 21°C. Spores from alternate generations (G12, G14, G16, G18 and G20) were preserved at -20°C for further work. As control, twenty successive generations were also produced on a PDA medium without fungicides.

For each isolate, the whole experiment was carried out three times independently, providing three lineages of 20 generations produced under selection pressure and three independent control lineages produced on PDA. To facilitate reading and avoid lengthy repetitions in the rest of this paper, control generations produced on unamended-PDA medium and generations produced in presence of pyrrolnitrin or iprodione will be labelled GnC, GnP and GnI respectively, where n indicates the generation rank in the lineage.

Determination of pyrrolnitrin and fungicides sensitivity

Sensitivity to pyrrolnitrin and to iprodione and other fungicides was compared between all the lineages of the pyrrolnitrin-induced mutants G20P, the iprodione-induced mutants G20I, the

control generations produced on PDA G20C and the parental generations G0 of isolates BC1, BC21, BC25, BC26 and H6. To determine the sensitivity to the antibiotic pyrrolnitrin, the mycelial growth was measured on PDA medium containing different concentrations of pyrrolnitrin as described by Ajouz et al. (2010). Sensitivity to 13 fungicides belonging to 10 chemical families was determined as described previously (Leroux and Clerjeau, 1985). The fungicides were of technical grade and were kindly supplied by the manufacturers. They were dissolved in ethanol or acetone and then added to molten media after autoclaving. For a generation of a given isolate, the level of resistance to the different fungicides was evaluated based on spore germination and germ tube elongation at 21°C. The experiments were all repeated three times independently per lineage, each with three replicate plates. The 50% effective concentration (EC₅₀) was estimated for pyrrolnitrin, iprodione, fludioxonil and dicloran as described by Leroux et al. (1999). For pyrrolnitrin, each pyrrolnitrin- and iprodione-induced mutants were categorized as high level of resistance (EC₅₀>0.5 µg.mL⁻¹, HR), moderate level of resistance (EC₅₀ comprised between 0.1 and 0.5 µg.mL⁻¹, MR), low level of resistance (EC₅₀ comprised between 0.01 and 0.1 µg.mL⁻¹, LR) and sensitive (EC₅₀<0.01 µg.mL⁻¹, S). For the other fungicides, the discriminatory concentration was used to categorize the isolates into sensitive and resistant to each molecule (Leroux et al., 1999).

Osmotic stress assay

Sensitivity to osmotic stress was compared between all the lineages of the pyrrolnitrin-induced mutants G20P, the iprodione-induced mutants G20I, the control generations produced on PDA G20C and the parental generations G0 of isolates BC1, BC21, BC25, BC26 and H6. To determine *in vitro* sensitivity to osmotic stress, PDA plates were amended with 1M of sodium chloride or 1M of sorbitol. The plates were then inoculated with 5-mm mycelium plug taken from the periphery of a 4-day-old colony. Cultures were incubated for 4 days at 21°C and growth behaviour was assessed in two categories: absence or presence of a mycelium development. Three replicate plates were realized for each treatment and this experiment was performed three times.

Estimation of fitness cost *in vitro* and *in planta* of the iprodione-induced mutants

Different fitness parameters were compared between all the lineages of the iprodione-induced mutants G20I, the control generations produced on PDA G20C and for the parental generations G0 of isolates BC1, BC21, BC25, BC26 and H6, . These fitness parameters included mycelial growth, spore production and aggressiveness on plant tissues as already described (Ajouz et al., 2010).

Mycelial growth and sporulation were assessed *in vitro* on PDA medium. To this end, a 5-mm mycelial plug was excised from the periphery of a 4-day-old colony and transferred to the centre of a fresh PDA Petri plate. The plates were incubated at 21°C and colony diameter was monitored for three days after inoculation. The colony diameter at 3 days and the daily radial growth rate between 1 and 3 days after inoculation were estimated. Sporulation was computed as the number of spores produced per Petri plate, after 14 days of incubation at 21°C. The experiments were repeated three times, each with three replicates. Statistical analyses were performed separately for each isolate and each type of fitness parameter. In these analyses, we used the ANOVA module of Statistica software to test both a possible lineage effect and a generation effect. When a significant effect was observed, the multiple comparison test of Student-Newman-Keuls was used to compare the means.

The aggressiveness of iprodione-induced mutants G20I obtained with isolates BC1, BC21, BC25, BC26 and H6 was assessed on apple fruits cv. Golden and tomato cv. Monalbo plants as explained previously (Ajouz et al., 2010). In these tests, three 2 mm-wounds were inflicted on the surface of the fruit and immediately inoculated with 10 µL of a spore suspension of *B. cinerea* containing 10⁶ spores per mL. Apples were incubated in a growth chamber at 21°C. The lesion diameters were monitored daily for 7 days after inoculation. For tomato plants, two types of bioassays were used with two independent sets of plants. To test the aggressiveness of *B. cinerea* on the stem, leaves were removed from the plants leaving a 5-10 mm petiole stub on the stems and spores were inoculated on the petiole stubs. The lengths of resulting stem lesions were monitored daily for 7 days after inoculation. The aggressiveness of the iprodione-induced mutants BC26G20I was also tested on petioles. To this end, leaves were removed from the plants leaving a 50 mm petiole stub and 10 µL of spore suspension containing 10⁷ spores per mL were deposited on the wound. The length of lesions on petiole stubs was monitored daily for 7 days after inoculation. All plants were incubated in a growth chamber with a photoperiod of 14 hours and maintained at 21°C with a relative humidity above 90%. For each isolate, the aggressiveness of the three lineages was tested. The

experiments were all repeated three times independently per lineage, each with three replicate plants or fruits. To take into account the kinetics of disease development for each isolate, we computed the area under the disease progress curve (AUDPC) as described by Decognet et al. (2009). Statistical analyses were performed separately for each isolate on the AUDPC values. In these analyses, we used the ANOVA module of Statistica software to test both a possible lineage effect and a generation effect. When a significant effect was observed, the multiple comparison test of Student-Newman-Keuls was used to compare the means. Generation G20C, produced on iprodione-free medium, was included in all tests for comparison.

Genomic DNA extractions, PCR amplification and sequence

Genomic DNA was extracted from approximately 1 g of fresh fungal mycelium using a Sarcosyl-based protocol (Dellaporta et al., 1983). The DNA fragments for sequencing purposes were amplified using specific primers (Liu, 2008). The primer couple bos1-F3 and bos1-R2 amplified the fragment encoding the N-terminal moiety of the Bos1 histidine kinase harboring the HAMP domains, the couple His1 and HK2 the C-terminal half of the Bos1 protein, the couple sak1-LP1 and sak1-RP1 amplified the coding region of the MAPK encoding gene *sak1* and the couple skn7-RP1 and skn7-LP1 that of the response regulator encoding gene *skn7*. The PCR reactions were carried out with high-fidelity DNA polymerase (Phusion, Finnzymes) and gel-purified prior to the sequencing reactions. The resulting sequences were quality analyzed and aligned to the reference sequences using the CodonCode Aligner software (CodonCode Corp., Dedham, MA). The six 90-amino-acid repeats of the N-terminal domain of *Bos1* were aligned according to Cui et al. (2002), using the Clustal software (Larkin et al., 2007).

Results

Resistance of pyrrolnitrin-induced mutants to pyrrolnitrin, fungicides and osmotic stress

The sensitivity of pyrrolnitrin-induced mutants to pyrrolnitrin, to 13 fungicides including iprodione and to osmotic stress were investigated in *in vitro* tests. High levels of resistance to pyrrolnitrin were obtained for all the pyrrolnitrin-induced mutants G20P (Table 2), as already described by Ajouz et al. (2010). High levels of resistance to iprodione were also observed

Table 2 Resistance of pyrrolnitrin-induced mutants of *B. cinerea* to pyrrolnitrin, iprodione, fenpiclonil, fludioxonil and dicloran.

Isolate	Generation ^a	Pyrrolnitrin	EC ₅₀ values of <i>B.cinerea</i> in µg ml ⁻¹			
			Iprodione (Dicarboximides) ^b	Fenpiclonil (Phenylpyrroles)	Fludioxonil	Dicloran (Aromatic hydrocarbon)
BC1	G0	0.005	6	0.1	0.025	30
	G20C	0.005	6	0.1	0.025	30
	G20P	8.7	>25	>10	>10	>30
BC25	G0	0.005	1	0.06	0.015	5
	G20C	0.005	1	0.06	0.015	5
	G20P	9.0	>25	9	10	>30
BC26	G0	0.006	10	0.03	0.03	30
	G20C	0.006	8	0.03	0.03	30
	G20P	7.4	>25	>10	>10	>30
H6	G0	0.001	1.5	0.02	0.02	5
	G20C	0.001	1.5	0.02	0.02	4
	G20P	4.6	>25	10	10	5

^a G0 is the wild-type parent isolate, G20C is the 20th control generation produced on PDA, G20P 20th generation produced on PDA amended with pyrrolnitrine.

^b Chemical family of fungicide

for these mutants with EC₅₀ values superior to 25 µg ml⁻¹ (Table 2). Test of sensitivity to the other fungicides revealed that the resistance to pyrrolnitrin generated a resistance to the phenylpyrroles and to the aromatic hydrocarbon fungicides (Table 2). Pyrrolnitrin-induced mutants G20P did not cross-resist with the other fungicides tested besides the resistances contributed by their parental strains. Finally, pyrrolnitrin-induced mutants G20P were very sensitive to osmotic pressure resulting from 1 M sodium chloride and 1 M sorbitol compared with the wild-type parents G0. Figure 1 shows the growth phenotype of one lineage of a G20P mutant from BC1. The growth behaviour of all other isolates and G20P mutants was similar (data not shown). The osmosensitive phenotypes occurred in parallel with high resistances to either iprodione or pyrrolnitrin.

Resistance of iprodione-induced mutants to iprodione, pyrrolnitrin, fungicides and osmotic stress

The sensitivity of iprodione-induced mutants to pyrrolnitrin, to 13 fungicides including iprodione and to osmotic stress were investigated in *in vitro* tests. High levels of resistance to iprodione were obtained for all the iprodione-induced mutants G20I with a EC₅₀ superior to 25 µg ml⁻¹ (Table 3). Iprodione-induced mutants G20I were also resistant to the antibiotic pyrrolnitrin but the level of resistance of the different mutants produced was very variable with EC₅₀ comprised between 0.03 µg ml⁻¹ and over 0.5 µg ml⁻¹ (Table 3). Resistance to iprodione conferred a resistance to the phenylpyrroles and to the aromatic hydrocarbon fungicides (Table 3). Iprodione-induced mutants G20I did not cross-resist with the other fungicides tested and they retained the same phenotypes as their wild type parent isolates G0 (Table 1). Finally, these mutants were very sensitive to osmotic pressure resulting from 1 M sodium chloride and 1 M sorbitol compared with the wild-type parents G0. Figure 1 shows the growth phenotype of one lineage of a G20I mutant from BC1. The growth behaviour of all other isolates and G20I mutants was similar (data not shown). The osmosensitive phenotypes occurred in parallel with resistances to iprodione and pyrrolnitrin.

Fitness of iprodione-induced mutants

Different parameters of fitness were studied for the parental generation G0, the control generations G20C and for all the lineages of the iprodione-induced mutants G20I. These fitness parameters included mycelial growth and spore production assessed on PDA medium

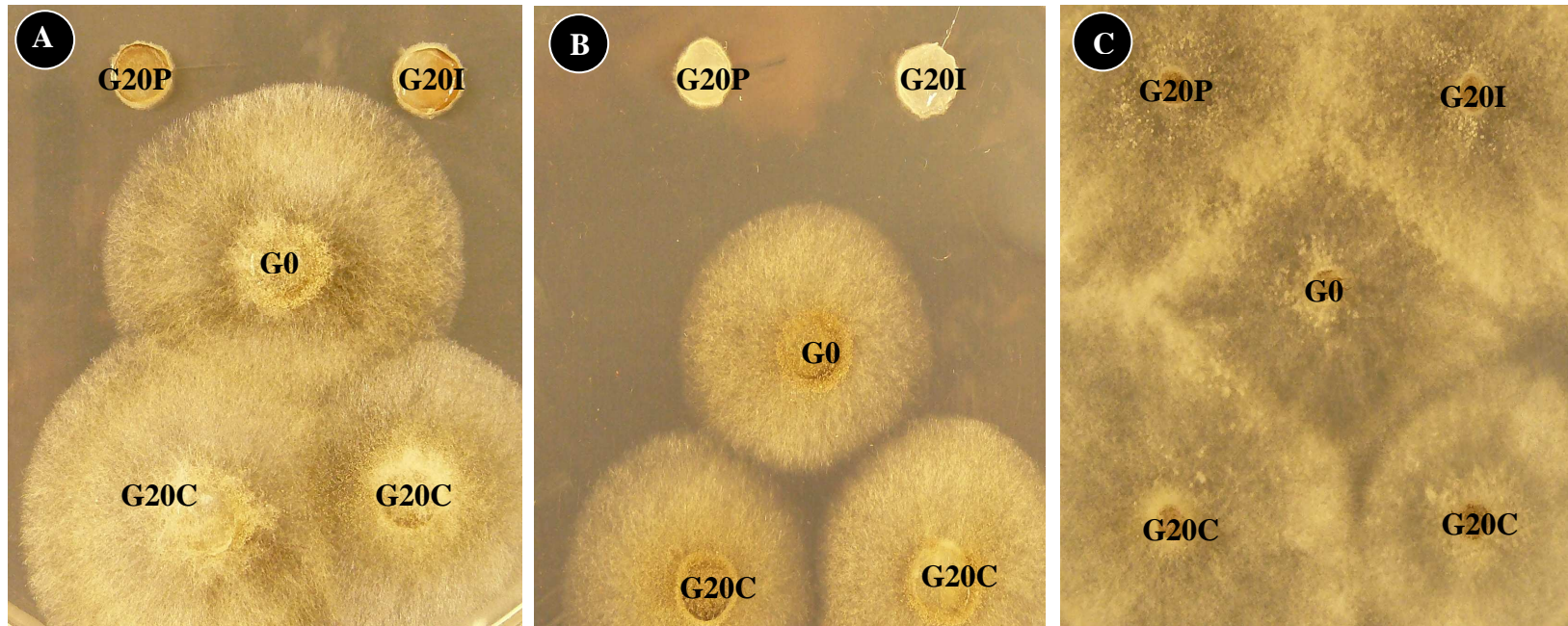


Figure 1 Sensitivity to osmotic stress of the pyrrolnitrin-induced mutants (G20P), the iprodione-induced mutants (G20I), the control generations (G20C) and the wild-type parent (G0) of the isolate BC1. Plate amended with 1M sodium chloride (**A**) and with 1M sorbitol (**B**) show mycelial growth for G0 and G20C and absence of mycelial growth for G20P and G20I. Control plates show mycelial growth for G0, G20C, G20P and G20I on PDA medium (**C**). Plates were incubated for 4 days at 21°C.

Table 3 Resistance of iprodione-induced mutants of *B. cinerea* to pyrrolnitrin, iprodione, phenylpyrroles and dicloran.

Isolate	Generation ^a	EC ₅₀ values of <i>B. cinerea</i> in µg ml ⁻¹				
		Pyrrolnitrin	Iprodione (Dicarboximides) ^b	Fenpiclonil (Phenylpyrroles)	Fludioxonil	Dicloran (Aromatic hydrocarbon)
BC1	G0	0.005	6	0.1	0.025	30
	G20C	0.005	6	0.1	0.025	30
	G20I1	0.10	>25	3	1.5	>30
	G20I2	>0.5	>25	3	1.5	>30
	G20I3	0.03	>25	3	1.5	>30
BC21	G0	0.007	>2.5	>0.5	>0.2	6
	G20C	0.007	>2.5	>0.5	>0.2	6
	G20I1	>0.5	>25	5.5	10	>30
	G20I2	>0.5	>25	0.3	0.1	>30
	G20I3	>0.5	>25	nd	nd	>30
BC25	G0	0.005	1	0.06	0.015	5
	G20C	0.005	1	0.06	0.015	5
	G20I1	>0.5	>25	2.15	10	>30
	G20I2	0.40	>25	1	0.75	>30
	G20I3	0.40	>25	3.8	>10	>30
BC26	G0	0.006	10	0.03	0.03	30
	G20C	0.006	8	0.03	0.03	30
	G20I1	0.08	>25	1	0.9	>30
	G20I2	>0.5	>25	nd	nd	nd
	G20I3	0.11	>25	1	0.3	
H6	G0	0.001	1.5	0.02	0.02	5
	G20C	0.001	1.5	0.02	0.02	4
	G20I1	>0.1	nd ^c	nd	nd	5
	G20I2	0.06	>25	0.3	< 0.1	5
	G20I3	0.06	>25	0.4	0.2	5

^a G0 is the wild-type parent isolate, G20C is the 20th control generation produced on PDA, G20P and G20I are the 20th generation produced on PDA amended with Pyrrolnitrin and Iprodione, respectively, and the numbers are for lineage 1, 2 and 3.

^b Chemical family of fungicide

^c nd = not done

Table 4 Comparison of fitness parameters between iprodione-induced generations G20I, control generations G20C and the wild-type parent isolates G0. The different components of fitness evaluated are colony diameter 3 days after inoculation (mm), daily radial growth rate between the 1st and 3rd day after inoculation (mm per day), spore production on PDA medium 14 days after inoculation (number of spores produced per Petri plate) and aggressiveness on tomato plant and apple fruits.

<i>Botrytis cinerea</i> isolate	Generation tested	Mycelium		Sporulation		Aggressiveness (AUDPC)							
		colony diameter (3DAI)	daily radial growth	x10 ⁶ spores per plate	tomato plant		apple						
					mm	mm/day	petiole stub	stem					
BC1	G0 ^a	81.7	a	31.3	a	144.3	a	- ^b	82.2	a	184.1	a	
	G20C	79.0	a	32.2	a	157.2	a	-	68.3	a	139.0	b	
	G20I	36.3	b	13.7	b	24.7	b	-	7.4	b	19.3	c	
BC21	G0	61.7		25.0	a	57.2	a	-	65.3	a	161.3	a	
	G20C	58.3		23.8	a	51.2	a	-	61.4	a	144.4	a	
	G20I	41.7		17.0	b	3.8	b	-	4.5	b	23.9	b	
BC25	G0	70.0	a	24.7	a	93.7	a	-	-		126.7	a	
	G20C	66.7	b	23.5	a	98.3	a	-	-		124.8	a	
	G20I	40.3	c	13.8	b	7.3	b	-	-		18.3	b	
BC26	G0	55.0	a	20.0	a	76.5	a	66.6	a		-	114.0	a
	G20C	55.7	a	20.3	a	66.2	a	83.1	a		-	111.1	a
	G20I	33.7	b	12.3	b	17.8	b	14.8	b		-	12.1	b
H6	G0	53.0	a	18.7	a	97.0	a	-	-		-	89.5	a
	G20C	50.3	a	17.7	a	91.6	a	-	-		-	94.3	a
	G20I	40.7	b	16.3	b	3.5	b	-	-		-	13.6	b

Data are means of the three lineages. For each isolate, means within a column followed by the same letter were not significantly different (ANOVA, $\alpha = 0.05$; Newman-Keuls test).

^a G0 is the wild-type parent isolate, G20C is the 20th generation produced on PDA medium without iprodione (control) and G20I is the 20th generation produced on PDA amended with iprodione.

^b - = not done or not relevant

and aggressiveness on apple fruits and tomato plants. There was no significant lineage effect for mycelial growth and sporulation on PDA medium for any of the isolates ($P > 0.05$). The mycelial growth of the iprodione-induced mutants G20I was significantly reduced for each isolate compared with G0 and G20C ($P < 0.0001$ for BC1, $P = 0.0005$ for BC21, $P < 0.00001$ for BC25, $P < 0.0001$ for BC26 and $P = 0.0001$ for H6) (Table 4). Spore production of the iprodione-induced mutants G20I was also significantly reduced for every isolate compared to G0 and G20C ($P = 0.002$, 0.047 , 0.027 , 0.0007 and 0.002 for BC1, BC21, BC25, BC26 and H6, respectively) (Table 4).

There was no significant lineage effect for the aggressiveness of any of the isolates ($P > 0.05$). For each of the five isolates tested, the iprodione-induced mutants G20I were significantly less aggressive on apple fruits than the parental isolates G0 and the control generations G20C (Table 4). On tomato plants, a decrease in aggressiveness was observed with iprodione-induced mutants G20I of isolates BC1, BC21 and BC26 compared to G0 and G20C (Table 4). Taken together, these results showed for all strains, a reduced *in vitro* growth rate, a severely reduced sporulation rate, and 5 to 10 fold reductions in lesion development according to the tested plant hosts.

DNA sequences of the HAMP domains of the *Bos1* gene

As underlined above, mutants selected on pyrrolnitrin or iprodione showed nearly identical phenotypes concerning fungicide resistance profiles, but particularly concerning sensitivity to hyperosmotic conditions, suggesting similar resistance mechanisms. As most of iprodione resistant mutants from *B. cinerea* resulted in modification of a class III histidine kinase involved in osmosensing, the part of the corresponding *bos1* gene from *B. cinerea* (Cui et al., 2002; Viaud et al., 2006) covering the HAMP domains potentially involved in signal transduction was sequenced. Different changes were observed for the sequenced isolates as indicated in Table 5. The parental isolates BC1G0 and BC26G0 that are resistant to low iprodione concentrations (ImiR1) showed a modification of isoleucine at position 365 to serine (I365S). The same mutation was observed in all mutants derived from BC1 and BC26, but also in the iprodione resistant mutants derivative from strain H6 (H6 G20I1, G20I2, G20I3). Other mutations in this part of the Bos1 protein were selected in pyrrolnitrin and iprodione resistant mutants with high resistance to iprodione (ImiR4, Table 5). These mutations were more or less equally distributed over the 6 HAMP domains (Fig. 2).

Table 5 Point mutations in the *Bos1* gene of the pyrrolnitrin- and iprodione-induced mutants of *Botrytis cinerea* isolates.

Isolate	Generation ^a	Phenotype		Mutations ^d
		Pyrrolnitrin ^b	Iprodione ^c	
BC1	G0	S	ImiR1	I365S
	G20P1	HR	ImiR4	I365S + G311R
	G20P2	HR	ImiR4	I365S + G311E
	G20P3	HR	ImiR4	nd
	G20I1	LR	ImiR4	I365S + E692K
	G20I2	HR	ImiR4	I365S + E692K
	G20I3	LR	ImiR4	I365S + V239K
BC21	G0	S	ImiS	X
	G20I1	HR	ImiR4	G278D
	G20I2	HR	ImiR4	G323C
	G20I3	HR	ImiR4	nd
BC25	G0	S	ImiS	X
	G20P1	HR	ImiR4	G415D
	G20P2	HR	ImiR4	nd
	G20P3	HR	ImiR4	nd
	G20I1	HR	ImiR4	X
	G20I2	MR	ImiR4	A493T
	G20I3	MR	ImiR4	A493T
BC26	G0	S	ImiR1	I365S
	G20P1	HR	ImiR4	I365S + T581P
	G20P2	HR	ImiR4	I365S + T581P
	G20P3	HR	ImiR4	nd
	G20I1	LR	ImiR4	I365S + E529G
	G20I2	HR	ImiR4	I365S
	G20I3	MR	ImiR4	I365S + E529G
H6	G0	S	ImiS	X
	G20P1	HR	ImiR4	X
	G20P2	HR	ImiR4	X
	G20P3	HR	ImiR4	X
	G20I1	HR	ImiR4	I365S
	G20I2	LR	ImiR4	I365S + M427T
	G20I3	LR	ImiR4	I365S + M427T

^a G0 is the wild-type parent isolate, G20P and G20I are the 20th generation produced on PDA amended with Pyrrolnitrin and Iprodione, respectively, and the numbers are for lineage 1, 2 and 3.

^b S: Sensitive ($EC_{50} < 0.01 \mu\text{g ml}^{-1}$); LR: Low Resistance (EC_{50} from 0.01 to 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$); MR: Moderate Resistance (EC_{50} from 0.1 to 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$); HR: High Resistance ($EC_{50} > 0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$)

^c ImiS, ImiR1 and ImiR4 phenotypes are determined as described by Leroux et al. (1999)

^d X : no point mutation, nd : not done

Interestingly, in some cases, independently selected mutants from the same isolate recovered the same mutation, e.g. E692K in BC1G20I1 and G20I2, A493T in BC25 G20I2 and G20I3, T581P in BC26 G20P1 and G20P2, E529G in BC26 G20I1 and G20I3 or M427T in G20I2 and G20I3 (Table 5). However, the same mutations were selected only by identical treatments (pyrrolnitrin vs. iprodione). In some mutants no modification of the Bos1 histidine kinase was identified, neither in the HAMP domains nor in the other part of the protein (Table 5) as in the iprodione resistant mutant BC25 G20I1 or in all pyrrolnitrin-induced mutants from isolate H6. We also analysed the coding sequences of the two proteins downstream of Bos1 in these mutants. The Sak1 MAPK is the ultimate protein kinase of the osmotic signal transduction pathway in *B. cinerea* controlled by Bos1, but not involved in the resistance to dicarboximides and phenylpyrroles (Liu et al., 2008; Segmüller et al., 2007). Another protein controlled by class III histidine kinases and necessary for resistance to these fungicides in several fungal species is the response regulator Skn7 (Izumitsu et al., 2009; Izumitsu et al., 2007). One sole ortholog of yeast Skn7 was found in the available *B. cinerea* genome sequence (Liu, 2008). No modification neither of Sak1 nor of Skn7 coding sequences were identified in the isolates BC25 G20I1, H6 G20P1, G20P2, G20P3 (data not shown).

Discussion

The present study provides for the first time evidence that a fungicide pressure exerted on a fungal plant pathogen was able to build-up resistance to an antibiotic produced by a biological control agent. Resistance to the antibiotic pyrrolnitrin has occurred when *B. cinerea* was exposed to the fungicide iprodione *in vitro*. In addition, adaptation to iprodione generated a resistance to the phenylpyrroles and aromatic hydrocarbons fungicides. Similarly, adaptation of *B. cinerea* to the antibiotic pyrrolnitrin systematically resulted in an acquisition of a resistance to the phenylpyrroles, dicarboximides and aromatic hydrocarbons fungicides. Similar results have been reported with phenylpyrroles, a family of fungicides structurally analogues to pyrrolnitrin. Laboratory-induced mutants of *B. cinerea* resistant to both phenylpyrroles and dicarboximides have been described (Cui et al., 2002; Faretra and Pollastro, 1993; Hilber et al., 1995; Leroux, 2004). However, in this study, levels of resistance to pyrrolnitrin of several iprodione-induced mutants that were resistant to high doses of iprodione, were inferior to that attained by the pyrrolnitrin-induced mutants. On the opposite, the level of resistance to iprodione of the pyrrolnitrin-induced mutants was similar to that attained by the iprodione-induced mutants. Using laboratory-induced mutants, Okada et al.

(2005) also observed that some mutants of *Neurospora crassa* are resistant to high doses of fludioxonil while they are inhibited by pyrrolnitrin.

The resistance of *B. cinerea* to iprodione was systematically associated with reduced growth potential (mycelial growth and spore production). Our study also showed decreased aggressiveness on plants or fruits (reduction of lesion growth). This fitness cost was similarly high for all the iprodione-induced mutants obtained from the five isolates tested. In a previous study, the resistance of *B. cinerea* to the antibiotic pyrrolnitrin was also systematically associated with a cost of fitness (Ajouz et al., 2010). These fitness costs were similar between the iprodione-induced mutants obtained in this study and the pyrrolnitrin-induced mutants (Ajouz et al., 2010). Our results are consistent with those reported in other studies regarding association between fitness and resistance to dicarboximide and phenylpyrrole fungicides in *B. cinerea* (Cui et al., 2002; Leroux, 2004; Ziogas et al., 2005). For instance, a comparison of fitness among wild-type isolates and fludioxonil-resistant mutants of *B. cinerea* showed that all fludioxonil-resistant mutants had significant reductions in the characteristics that determine saprophytic fitness, such as mycelial growth, sporulation, conidial germination and sclerotial production (Ziogas et al., 2005). Reduced fitness has been suggested as a possible explanation for the absence of field isolates highly resistant to dicarboximides and phenylpyrroles (Leroux, 2004). One practical consequence of this phenomenon is that if pyrrolnitrin and iprodione resistance occurred in the field, the associated detrimental effect on the resistant mutant and competition exerted by sensitive strains would limit the risk of efficacy loss of fungicides or of pyrrolnitrin-producing biological control agents. Moreover the resistance of *B. cinerea* to pyrrolnitrin and iprodione was also systematically associated with a high sensitivity to osmotic stress. This last point suggests that these mutations lead to a differential regulation of the function of osmosensibility pathway. Okada et al. (2005) suggested that a primary antifungal mechanism of pyrrolnitrin against *Neurospora crassa* is interference with the osmotic signal transduction pathway rather than inhibition of respiration.

In our study, the sequence comparison of the histidine kinase encoding gene *bos1* of the ImiS and ImiR1 isolates revealed that the mutation leading to low dicarboximide resistance levels without cross resistance to phenylpyrroles (ImiR1) was that of isoleucine at position 365 to serine. The recapitulation of known mutations in the HAMP domains of the Bos1 histidine kinase (Fig. 2) shows that the principal mutations leading to the phenotype ImiR1 were those of isoleucine at position 365 to serine, asparagine or arginine (Cui et al., 2004; Cui et al., 2002; Ma et al., 2007; Oshima et al., 2002). Two other single mutations have been observed,

E345G and S531N, in laboratory-selected ImiR1 mutants (Cui et al., 2002). Mutations of the amino-acid residues 368, 369, and 607 also lead to low dicarboximide resistance only in combination with mutations at positions 365, 373, and 447 (Fig. 2).

Mutations found in mutants having high resistance levels to dicarboximides (ImiR4) and resistance to pyrrolnitrin were found in all HAMP domains, with the exception of the HAMP1. The alignment of the 6 HAMP domains in Fig. 2 shows that this type of mutations affected residues highly conserved among the repeats, e.g. the leucine, 16th residue in HAMP2 to HAMP6, alanine 31st, glycine 49th. Mutations affecting the same residue in different repeats lead to similar phenotypes with some exceptions such as for glutamate 71st and threonine 81st. The glutamate to glycine transition in HAMP2 (E345G) lead to ImiR1 phenotype (Cui et al., 2002), but the same transition in HAMP4 (E529G) lead to ImiR4 phenotype in combination with the I365S mutation (this study). Surprisingly, this mutation was associated to low to moderate resistance to pyrrolnitrin (Table 5). Concerning the threonine at position 81, the situation is comparable. When mutated in HAMP2 (T355P) and combined to G691E (glycine 49th) it conferred high resistance levels (ImiR4, Leroux et al., unpublished). Mutations of the corresponding threonine in HAMP3 (T447S) combined to V368F and Q369H, lead to low resistance levels (Oshima et al., 2002). These results suggest that combinations of different mutations and types of modifications (conservative or not) differentially impact the fungicide resistance phenotypes.

In this study, the same mutations were generally observed for all the independent repetitions of each isolate whereas different mutations were systematically identified between the different isolates. This suggests that for one specific isolate of *B. cinerea* the same mutations may systematically occur. Two assumptions can be done to explain this phenomenon. It can be due to an initial heterokaryon with the presence of the selected mutation. But, in this study, we observed that the selection pressure exerted by iprodione and pyrrolnitrin did not systematically lead to the selection of identical mutations, what appears to invalidate this assumption. This can also be due to the genetic context that may induce the selection of preferential mutations in one isolate. Cui et al. (2004) also found several times the same mutation in different field isolates. To fulfil this hypothesis, comparison of the sequence of the *bos1* gene should be done on numerous iprodione- or pyrrolnitrin-induced mutants of a given isolate.

Mutations leading to the ImiR4 phenotype resemble those of the *bos1* deletion mutants that concerned other fungicide resistance, osmosensitivity, and to a lesser extent, reduction of growth, sporulation and virulence (Liu et al., 2008; Viaud et al., 2006). These point mutations

may be considered as loss-of-function mutations, blocking the transmission of the external signal to the cytoplasmic protein kinases and downstream targets. One ultimate phosphorylation target of the Bos1 histidine kinase is the Sak1 MAPK, phosphorylated after the exposure to dicarboximides, phenylpyrrols, hyperosmotic and oxidative stresses. The *bos1* deletion leads to constitutive Sak1-phosphorylation (Liu et al., 2008). In the case of our ImiR4 mutants, such a constitutive Sak1 phosphorylation pattern was generally not observed in preliminary Western-blot analyses (data not shown).

As general features from this and previous studies (Cui et al., 2002; Oshima et al., 2002), it can be considered that iprodione and pyrrolnitrin selections generally lead to the same type of mutations. However, for several highly resistant mutants ImiR4 selected on pyrrolnitrin or iprodione, the resistance mechanisms have not been elucidated yet. For instance, mutations were not detected for the isolate H6 in the 3 pyrrolnitrin-induced mutants. The absence of point mutations in these mutants was also noticed in other genes implicated in the MAP kinase cascade. Only when the whole signal transduction pathway of pyrrolnitrin *via* Bos1 is known, the mutation(s) leading to the ImiR4 phenotype in these isolates may be identified.

Reduced fitness of highly resistant isolates was observed for both types of mutants, strongly suggesting that pyrrolnitrin based treatments against *B. cinerea* might be efficient and sustainable. In practical terms, the development of reduced susceptibility to pyrrolnitrin in *B. cinerea* populations, if it should occur, may not necessarily compromise the efficacy of pyrrolnitrin-producing biocontrol agents.

Acknowledgements

The authors grateful acknowledge Claire Troulet, Gisèle Riqueau, Johan Confais and Christiane Auclair for excellent technical assistance. This work was supported in part by the French National Research Agency (ECOSERRE project) and by a grant from INRA (SPE project).

References

Ajouz, S., et al., 2010. Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. Plant Pathology. in press.

- Arima, K., et al., 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 28, 275–276.
- Avenot, H., et al., 2005. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene AbNIK1 from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Current Genetics*. 47, 234-243.
- Chernin, L., et al., 1996. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Current Microbiology*. 32, 208-212.
- Cui, W., et al., 2004. Evolution of an osmosensing histidine kinase in field strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in response to dicarboximide fungicide usage. *Phytopathology*. 94, 1129-1135.
- Cui, W., et al., 2002. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genetics and Biology*. 36, 187-198.
- Decognet, V., et al., 2009. Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathology*. 99, 185-193.
- Dellaporta, S. L., et al., 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1, 19-21.
- Dry, I. B., et al., 2004. Dicarboximide resistance in field isolates of *Alternaria alternata* is mediated by a mutation in a two-component histidine kinase gene. *Fungal Genetics and Biology*. 41, 102-108.
- Duffy, B., et al., 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology*. 41, 501-538.
- Elad, Y., Stewart, A., *Microbial control of Botrytis spp.* In: Y. Elad, et al., (Eds.), *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 223–41.
- Elmer, P. A. G., Reglinski, T., 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*. 55, 155-177.
- Faretra, F., Pollastro, S., 1993. Isolation, characterization, and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to the phenylpyrrole fungicide CGA 173506. *Mycological Research*. 97, 620-624.
- Hammer, P. E., et al., 1999. Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. *FEMS Microbiology Letters*. 180, 39-44.

- Hilber, U. W., et al., 1995. Comparative resistance patterns of fludioxonil and vinclozolin in *botryotinia fuckeliana*. *Journal of Phytopathology - Phytopathologische Zeitschrift*. 143, 423-428.
- Izumitsu, K., et al., 2009. *Dic2* and *Dic3* loci confer osmotic adaptation and fungicidal sensitivity independent of the HOG pathway in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycological Research*. 113, 1208-1215.
- Izumitsu, K., et al., 2007. Two-component response regulators Ssk1p and Skn7p additively regulate high-osmolarity adaptation and fungicide sensitivity in *Cochliobolus heterostrophus*. *Eukaryotic Cell*. 6, 171-181.
- Janisiewicz, W. J., Roitman, J., 1988. Biological control of blue mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*. 78, 1697-1700.
- Jarvis, R. W., 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology, and pathogenicity. Canada Department of Agriculture, Ottawa.
- Kanetis, L., et al., 2008. Characterization of genetic and biochemical mechanisms of fludioxonil and pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology*. 98, 205-214.
- Larkin, M. A., et al., 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23, 2947-2948.
- Leroux, P., Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Y. Elad, et al., (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Press, The Netherlands, 2004, pp. 195-222.
- Leroux, P., et al., 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*. 18, 687-697.
- Leroux, P., Clerjeau, M., 1985. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers and *Plasmopara viticola* (Berk & Curt) Berl and de Toni to fungicides in French vineyards. *Crop Protection*. 4, 137-160.
- Leroux, P., et al., 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*. 58, 876-888.
- Liu, W., Caractérisation de la cascade de signalisation osmotique "os" chez *Botrytis cinerea*. University of Paris-Sud XI Orsay, France 2008.
- Liu, W., et al., 2008. The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole-resistance. *Fungal Genetics and Biology*. 45, 1062-1074.

- Ma, Z. H., et al., 2006. Molecular characterization of the two-component histidine kinase gene from *Monilinia fructicola*. *Pest Management Science*. 62, 991-998.
- Ma, Z. H., et al., 2007. Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 88, 300-306.
- Myresiotis, C. K., et al., 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*. 91, 407-413.
- Nathues, E., et al., 2007. The histidine kinase CpHK2 has impact on spore germination, oxidative stress and fungicide resistance, and virulence of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Molecular Plant Pathology*. 8, 653-665.
- Okada, A., et al., 2005. Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa*. *Journal of Pesticide Science*. 30, 378-383.
- Orth, A. B., et al., 1995. A serine (threonine) protein kinase confers fungicide resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Applied And Environmental Microbiology*. 61, 2341-2345.
- Oshima, M., et al., 2002. A point mutation in the two-component histidine kinase BcOS-1 gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 92, 75-80.
- Pillonel, C., Meyer, T., 1997. Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pesticide Science*. 49, 229-236.
- Raaijmakers, J. M., et al., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81, 537-547.
- Segmüller, N., et al., 2007. BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryotic Cell*. 6, 211-221.
- Viaud, M., et al., 2006. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19, 1042-1050.
- Vignutelli, A., et al., 2002. Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research*. 106, 329-335.
- Ziogas, B. N., et al., 2005. Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *European Journal of Plant Pathology*. 113, 83-100.

Chapitre VI

Stabilité des marqueurs microsatellites chez *Botrytis cinerea* après exposition à différentes pressions de sélection.

Publication 5

Microsatellite stability in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* after exposure to different selective pressures.

S. Ajouz, V. Decognet P. C. Nicot and M. Bardin

(soumis à Mycological Research)

Microsatellite stability in the plant pathogen *Botrytis cinerea* after exposure to different selective pressures

Sakhr AJOUZ, Véronique DECOGNET, Philippe C. NICOT and Marc BARDIN*

INRA, UR407, Plant Pathology Unit, Domaine St Maurice, F-84140 Montfavet, France

* Corresponding author: INRA, UR407, Unité de Pathologie Végétale, Domaine St Maurice, F-84140 Montfavet, France. Phone: 33-432-72-28-55. Fax: 33-432-72-28-41. E-Mail: marc.bardin@avignon.inra.fr

Abstract

The stability of microsatellite markers was investigated in the spore-producing fungus *Botrytis cinerea* exposed to four different stresses. This knowledge is essential in order to differentiate mutations from genetic exchanges or recombination in population genetics studies. It is also important when using strains from collections that need to be regularly propagated on medium. Successive spore generations of four isolates of the fungus were realised in plates on different agar media: a nutriment-rich medium, a nutriment-poor medium, a medium supplemented with the antibiotic pyrrolnitrin and a medium supplemented with the fungicide iprodione. The stability of nine microsatellite markers was studied by comparing the molecular pattern obtained between the wild-type parent strains and the final generations obtained. The results showed that, despite the phenotypic changes observed in some generations, no changes were observed in the allele size at nine microsatellite loci whatever the selective pressure endured by the fungus. This is the first study that reveals long-term stability of microsatellite markers of a spore-producing fungus exposed to different stresses.

Keywords: experimental evolution, conidia, marker stability, selection pressure, population genetics

Introduction

During their natural life or during laboratory experiments, microorganisms undergo successive cycles of reproduction and are exposed to various environmental conditions. Some of these conditions may represent a stress to which they have to adapt. For certain fungi, stresses such as nutritive deficiency could increase mutation rates in the genome (Drake et al. 1998) by modifying the activity of transposable elements and inducing systems involved in the modification or repair of DNA (Ikeda et al. 2001; Mes et al. 2000).

Botrytis cinerea Pers.:Fr (teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) is a haploid necrotrophic fungal pathogen of numerous plants estimated to more than 200 species (Jarvis 1980). It is considered a high risk plant-pathogen due to its capacity to produce a massive amount of asexual spores (conidia) in a short time in absence of efficient control method (Nicot and Baille 1996) and to adapt to various control methods. Nine microsatellite markers were characterized in the fungus *B. cinerea* (Fournier et al. 2002) and have been applied to strain typing in population genetic studies (Decognet et al. 2009; Karchani-Balma et al. 2008; Vaczy et al. 2008). Microsatellite markers (simple sequence repeats) are short tandem repeated tracts of DNA composed of units that are 1–6 base-pairs long, spread throughout the genome and used as genetic markers in genome mapping or population genetics studies because of their high level of polymorphism (Jarne and Lagoda 1996). Their mutation rates are thought to vary from 10^{-6} to 10^{-3} per locus per gamete per generation depending on organism and locus (Schug et al. 1997; Weber and Wong 1993). Population studies of *B. cinerea* using microsatellite markers reveal a high level of genotypic variation (Decognet et al. 2009; Fournier et al. 2002; Karchani-Balma et al. 2008; Vaczy et al. 2008). This high genetic variability is interpreted as an indication of genetic exchange between distant populations (Decognet et al. 2009; Karchani-Balma et al. 2008) and/or an indirect proof of recombination (Karchani-Balma et al. 2008; Vaczy et al. 2008). However, mutations in the microsatellite loci overtime may also reveal diversity and therefore misinterpret the conclusions of these studies. In order to properly applying these markers in population studies, one should estimate the mutation rate of the microsatellite markers used. Lasker and Ran (2004) demonstrated the short-term stability of microsatellite profiles after the serial culture of *Penicillium marneffeii* during 7 to 8 weeks. More recently, Kohn et al. (2008) reported that no mutations were detected in alleles of 7 microsatellite loci after 400 days of continuous *in vitro* hyphal growth of 12 strains of the plant pathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum*. However, studies regarding at the stability of microsatellites markers in fungi that produce spores and are exposed to different selection pressure are missing.

Table 1 - Phenotypic and genotypic characteristics of the four isolates of *Botrytis cinerea* used in this study

Isolate of <i>Botrytis cinerea</i>	Haplotype ^a	Phenotypic characters						
		Aggressiveness ^b			Chemical family (active ingredients of fungicides)			
		Tomato plant	Apple fruit	Pyrrolnitrin	Dicarboximides (iprodione, vinclozolin)	Benzimidazoles (carbendazim)	Phenylpyrroles (fludioxonil)	Aromatic Hydrocarbons (dicloran)
BC1	H5	+++	+++	S ^c	R	S	S	R
BC25	H437	-	++	S	S	S	S	S
BC26	H829	+	++	S	R	S	S	R
H6	H830	-	++	S	S	R	S	S

^a Haplotype code was based on the allele size of the 9 microsatellite loci (Decognet et al. 2009)

^b +++ = high level of aggressiveness, ++ = moderate level of aggressiveness, + = low level of aggressiveness, - = not aggressive based on results obtained by Ajouz et al. (2010)

^c S = susceptible, R = resistant. For pyrrolnitrin, the dose used was 100µg L⁻¹ (Ajouz et al. 2010). For the fungicides, the discriminatory doses used were based on those proposed by Leroux et al. (1999)

The main purposes of this study were (i) to test the stability overtime of the 9 microsatellite markers developed for this fungus and (ii) to estimate the effect of different environmental stress on this stability in the case of the sporulating filamentous fungus *B. cinerea*.

Materials and methods

Characteristics of Botrytis cinerea isolates

Four single-spore isolates of *B. cinerea* with differing phenotypic and genotypic characteristics (Table 1) were used in this study. They were maintained in stock cultures stored at -20°C in a 0.06 M phosphate buffer containing 20% (V/V) of glycerol. Inoculum was produced in Petri dishes on Potato Dextrose Agar medium (PDA 39 g L⁻¹; Difco Laboratory, Detroit, Michigan) incubated under cool white fluorescent light (14-hour photoperiod – 65 μmole m⁻² s⁻¹) in a growth chamber at 21°C.

In vitro conidial-transfer experiment and stress conditions

Successive spore generations were produced in 55 mm diameter Petri plates on four agar media providing different stress conditions: a nutrient-rich medium (PDA), a nutrient-poor medium (containing 1 g L⁻¹ glucose and 15 g L⁻¹ agar), a medium (PDA) amended with the antibiotic pyrrolnitrin (Sigma chemical) and a medium (PDA) amended with the anti-*Botrytis* fungicide iprodione (BASF Agro SAS). For each isolate and set of stress conditions tested, three repetitions (lineages) of the successive generations were carried out independently. The method used to produce the successive generations on PDA and PDA amended with pyrrolnitrin was previously described (Ajouz et al. 2010). On PDA medium supplemented with iprodione ten successive generations were first produced in the presence of 5 mg L⁻¹ iprodione and 10 additional generations were obtained with increasing doses of the fungicide (from 10 mg L⁻¹ to 200 mg L⁻¹) as described in Table 2. For all of these conditions, each generation was incubated 14 days at 21°C allowing sufficient conidial production of *B. cinerea* to obtain the next generation. For the generations produced on the nutrient-poor medium, the method was slightly modified: each generation was incubated during a longer period (30 days at 21°C) in order to obtain sufficient amounts of spores to produce the next generation.

At the start of the experiment, we inoculated 40000 spores at the centre of a Petri dish. After 14 or 30 days of incubation, depending on the conditions tested, the averaged number of spores produced on the plates was close to 10⁸. To produce the next generation, spores were harvested from the plate

Table 2 - Composition of the medium used for the production of the different generations of the different isolates of *Botrytis cinerea* with the four different environmental stresses studied

Nature of stress	Isolates tested	Nomenclature of generations ^a	Composition of medium for the production of the different generations ^b						
			G0 ^c	G1-G10	G11-G12	G13-G14	G15-G16	G17-G18	G19-G20
Rich medium	BC1, BC25, BC26, H6	GnC	PDA	PDA	PDA	PDA	PDA	PDA	PDA
Poor medium	BC1, BC25, BC26, H6	GnN	PDA	Glucose 1 g L ⁻¹	-	-	-	-	-
Pyrrolnitrin	BC1, BC25, BC26, H6	GnP	PDA	10 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹	500 µg L ⁻¹	1000 µg L ⁻¹	2000 µg L ⁻¹	4000 µg L ⁻¹
Iprodione	BC1, BC25, BC26	GnI	PDA	5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	20 mg L ⁻¹	40 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	200 mg L ⁻¹

^a n is the number of generation realised (from 0 to 20)

^b for pyrrolnitrin and iprodione stress, the different doses of the antibiotic or fungicide used were added to PDA medium.

in 2 mL of a phosphate-glycerol buffer and 40000 spores of this spore suspension were deposited at the centre of a Petri plate with a fresh medium. After 20 generations, this corresponds to a cumulative production of approximately 2.10^9 asexual spores. As conidia of *B. cinerea* are multinucleate with numbers usually in the range 3-6 (Beever and Weeds 2004), the number of nuclei produced was estimated to approximate 10^{10} for each condition tested.

To avoid repeating long descriptions when referring to different generations, each one was given a code GnX, where n represented the generation rank (starting with 0 for the parental strain) and X took the values C, P, I or N if the generations were produced on, PDA, pyrrolnitrin-amended PDA, iprodione-amended PDA or on nutrient-poor medium, respectively (Table 2).

The cumulated durations of the successive cultures realised in the different conditions are equivalent to 140 days for G10P, 280 days for G20C and G20I, 294 days for G20P and 300 days for G10N.

Microsatellite marker analyses

To assess the stability of microsatellites, the microsatellite profiles of the parent isolates (G0) were compared to those of different lineages of the generations produced on PDA (G20C), on pyrrolnitrin (G10P and G20P), on iprodione (G20I) and in condition of nutritive stress (G10N).

Genomic DNA was extracted from 15 mg of lyophilized fungal material, obtained following the protocol described by Decognet et al. (2009), in 96-well plates according to the Dneasy Plant extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA). The microsatellite analysis was performed with the 9 markers developed for *B. cinerea* (Fournier et al. 2002). These 9 microsatellites loci present different size ranges and various types of core repeat motives (Fournier et al. 2002). The polymerase chain reactions were carried out with forward primers conjugated with fluorescent dyes IRD-700 or IRD-800 (MWG-Biotech, Courtaboeuf, France) and the PCR products were separated on a LI-COR IR² (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) sequencer (Decognet et al. 2009). Two internal reference strains (S1-4639 and S1-10877) were run along with samples to ensure constancy of allele sizing across the gels, as well as a 50-350 bp size ladder (ScienceTec, Les Ulis, France). Allele sizing was performed using SAGA^{GT} software (LI-COR). Each isolate was attributed a haplotype code based on the work from Decognet et al. (2009).

Table 3 - Phenotypic characteristics of the four wild type isolates of *Botrytis cinerea* and their generations produced on various conditions of stress: level of aggressiveness on tomato plant and on apple fruit, sensitivity to pyrrolnitrin and to different fungicides

Isolate	Generation (number of lineages) ^a	Nature of stress ^b	Phenotypic characters						
			Aggressiveness ^c		Pyrrolnitrin ^d	Chemical family (active ingredients of fungicides) ^d			
			Tomato	Apple		Dicarboximides (iprodione, vinclozolin)	Benzimidazoles (carbendazim)	Phenylpyrroles (fludioxonil)	Aromatic Hydrocarbons (dicloran)
BC1	G0		+++	+++	S	R	S	S	R
	G20C (2)	Rich medium	+++	+++	S	R	S	S	R
	G10N (3)	Poor medium	+++	+++	S	R	S	S	R
	G10P (3)	Pyrrolnitrin 10	+++	+++	S	R	S	S	R
	G20P (1)	Pyrrolnitrin 4000	+	+	R	R	S	R	R
	G20I (3)	Iprodione	+	+	nd	R	S	R	R
BC25	G0		-	++	S	S	S	S	S
	G20C (3)	Rich medium	-	++	S	S	S	S	S
	G10N (3)	Poor medium	-	++	S	S	S	S	S
	G10P (3)	Pyrrolnitrin 10	-	++	S	S	S	S	S
	G20P (1)	Pyrrolnitrin 4000	-	+	R	R	S	R	R
	G20I (3)	Iprodione	-	+	nd	R	S	R	R
BC26	G0		+	++	S	R	S	S	R
	G20C (2)	Rich medium	+	++	S	R	S	S	R
	G10N (2)	Poor medium	+	++	S	R	S	S	R
	G10P (3)	Pyrrolnitrin 10	+	++	S	R	S	S	R
	G20P (2)	Pyrrolnitrin 4000	-	+	R	R	S	R	R
	G20I (3)	Iprodione	-	+	nd	R	S	R	R
H6	G0		-	++	S	S	R	S	S
	G20C (2)	Rich medium	-	++	S	S	R	S	S
	G10N (2)	Poor medium	-	++	S	S	R	S	S
	G20P (3)	Pyrrolnitrin 4000	-	+	R	R	R	R	R

^a G0 is the wild type isolate and G10 and G20 are the tenth and twentieth generations obtained under the different conditions of stress tested; the numbers of lineages tested is indicated between brackets.

^b Rich medium = PDA, Poor medium = glucose (1g L⁻¹) agar, Pyrrolnitrin 10 = PDA + pyrrolnitrin at 10 µg L⁻¹, Pyrrolnitrin 4000 = PDA + increasing doses of pyrrolnitrin from 10 to 4000 µg L⁻¹, Iprodione = PDA + increasing doses of iprodione from 5 mg L⁻¹ to 200 mg L⁻¹.

^c +++ = high level of aggressiveness, ++ = moderate level of aggressiveness, + = low level of aggressiveness, - = not aggressive

^d S = susceptible, R = resistant, nd = not done. For pyrrolnitrin, the dose used was 100 µg L⁻¹ (Ajouz et al. 2010). For the fungicides, the discriminatory doses used were based on those proposed by Leroux et al. (1999)

Phenotypic characteristics analysis

To assess the phenotypic stability of the isolates grown under various stress conditions, four traits were used to compare the parent isolates (G0) to different lineages of the generations produced on PDA (G20C), on pyrrolnitrin (G10P and G20P), on iprodione (G20I) and in condition of nutritive stress (G10N). The phenotypic traits included aggressiveness to tomato and apple and sensitivity to pyrrolnitrin and to fungicides.

Tests of aggressiveness on apple fruits cv. Golden and on tomato plants cv. Monalbo were carried out as described by Ajouz et al. (2010). For a generation of a given isolate, the aggressiveness of the three lineages was tested in a growth chamber with a photoperiod of 14 hours and maintained at 21°C with a relative humidity above 90%. After inoculation of a calibrated spore suspension (10^6 spores ml^{-1}), the diameter of lesions on apples and the length of stem lesions on tomatoes were monitored daily for 7 days after inoculation. The experiments were all repeated three times independently per lineage, each with three replicate plants or fruits. To take into account the kinetics of disease development for each isolate, we computed the AUDPC as described by Decognet et al. (2009). To facilitate the comparison of aggressiveness, each generation of a given isolate was categorized as high level of aggressiveness (+++), moderate level of aggressiveness (++) , low level of aggressiveness (+) and not aggressive (-) in relation to reference strain BC1.

Sensitivity to the antibiotic pyrrolnitrin was assessed as described by Ajouz et al. (2010) using the discriminatory inhibition dose of 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sensitivity to fungicides were defined using the discriminatory inhibition concentrations (Leroux et al. 1999). For a generation of a given isolate, the level of resistance to pyrrolnitrin and fungicides of the three lineages was tested using a spore germination test at 21°C. The experiments were all repeated three times independently per lineage, each with three replicate plates. Each generation of a given isolate was categorized as susceptible (S) or resistant (R) to the given product.

Results***Phenotypic changes***

Resistance to the antibiotic pyrrolnitrin was observed for all the lineages of the four isolates tested after a total of 20 successive generations on increasing doses of pyrrolnitrin (G20P) (Table 3). Modification of resistance to the fungicide fludioxonil was also observed for all the lineages of the four isolates tested after a total of 20 successive generations produced in presence of pyrrolnitrin

Table 4 - Allele sizes at the nine microsatellite loci for the four wild type isolates of *Botrytis cinerea* and their generations produced on various conditions of stress

Isolate	Generation (number of lineages) ^a	Nature of stress ^b	Allele sizes of the microsatellite loci ^c									Haplotype ^d
			Bc1 (CTTT) ₁₀ ...- (CA) ₂ CG(CA) ₁₀	Bc2 (AC) ₁₂ AT (AC) ₄	Bc3 (GA) ₁₀	Bc4 (TTC) ₆ TTATC (TTC) ₂	Bc5 (AT) ₁₂	Bc6 (CA) ₁₀	Bc7 (TA) ₉	Bc9 (CT) ₁₁	Bc10 (AC) ₁₃	
BC1	G0		235	159	217	125	157	116	123	148	187	H5
	G20C (2)	Rich medium	235	159	217	125	157	116	123	148	187	H5
	G10N (3)	Poor medium	235	159	217	125	157	116	123	148	187	H5
	G10P (3)	Pyrrolnitritin	235	159	217	125	157	116	123	148	187	H5
	G20P (1)	Pyrrolnitritin	235	159	217	125	157	116	123	148	187	H5
	G20I (3)	Iprodione	235	159	217	125	157	116	123	148	187	H5
BC25	G0		215	151	213	125	155	132	117	144	175	H437
	G20C (3)	Rich medium	215	151	213	125	155	132	117	144	175	H437
	G10N (3)	Poor medium	215	151	213	125	155	132	117	144	175	H437
	G10P (3)	Pyrrolnitritin	215	151	213	125	155	132	117	144	175	H437
	G20P (1)	Pyrrolnitritin	215	151	213	125	155	132	117	144	175	H437
	G20I (3)	Iprodione	215	151	213	125	155	132	117	144	175	H437
BC26	G0		219	173	219	125	159	120	119	148	181	H829
	G20C (2)	Rich medium	219	173	219	125	159	120	119	148	181	H829
	G10N (2)	Poor medium	219	173	219	125	159	120	119	148	181	H829
	G10P (3)	Pyrrolnitritin	219	173	219	125	159	120	119	148	181	H829
	G20P (2)	Pyrrolnitritin	219	173	219	125	159	120	119	148	181	H829
	G20P (3)	Iprodione	219	173	219	125	159	120	119	148	181	H829
H6	G0		235	159	217	125	157	124	121	146	173	H830
	G20C (2)	Rich medium	235	159	217	125	157	124	121	146	173	H830
	G10N (2)	Poor medium	235	159	217	125	157	124	121	146	173	H830
	G20P (3)	Pyrrolnitritin	235	159	217	125	157	124	121	146	173	H830

^a between brackets, the number of lineages tested from each generation produced.

^b Rich medium = PDA, Poor medium = agar-glucose (1 g L⁻¹), Pyrrolnitritin = PDA + pyrrolnitritin, Iprodione = PDA + iprodione.

^c name and repeat motif of each microsatellite locus used in the study (Fournier et al. 2002)

^d Haplotype code is based on the allele size of the 9 microsatellite loci (Decognet et al. 2009)

(G20P) or iprodione (G20I) (Table 3). The two isolates sensitive to iprodione and dicloran (BC25 and H6) acquired resistance to these fungicides when grown on medium amended with pyrrolnitrin (G20P) or iprodione (G20I) (Table 3). Finally, no changes in the resistance of carbendazim were observed (Table 3). In parallel a modification in the level of aggressiveness on apple fruits and tomato plants was observed: the generations that acquired a resistance to pyrrolnitrin (G20P) were less aggressive compared to the corresponding control G0 isolates (Table 3).

Stability of the microsatellite genetic markers

The amplification products obtained with the 9 microsatellites revealed that the four isolates used in this study presented different haplotypes (Table 1). For each isolate, after the generations realised on rich PDA medium (G20C), poor glucose medium (G10N), pyrrolnitrin-amended medium (G10P and G20P) or iprodione-amended medium (G20I), the amplicons obtained were all of similar sizes at the 9 microsatellite loci whatever the motif and the size of the microsatellites core repeat (Table 4). The haplotypes remained identical whatever the selective pressure endured by the fungus, revealing a good stability of the microsatellites genetic markers in *B. cinerea* isolates (Table 4).

Discussion

The main purpose of the present study was to assess if an exposure of the filamentous fungus *B. cinerea* to different environmental stresses during successive conidial generations could have an effect on the stability of the microsatellite markers. Four isolates of *B. cinerea* with 3 independent replicates per isolate were exposed to four different selective pressures. Whatever the number of generations realized on Petri plates (G10 or G20), the duration of the consecutive transfers (280 to 300 days of successive cultures) and the nature of stress endured by the fungus, no mutations were observed in alleles at the 9 microsatellite loci studied. As conidia of *B. cinerea* are multinucleate with numbers usually in the range of 3 to 6 (Beever and Weeds 2004), the number of nuclei produced for each of the four conditions tested probably approximates 10^{10} , without a single genotypic change observed in the microsatellite loci while phenotypic changes have been observed. Moreover, stability was not affected by the core repeat motif and the size range of the microsatellite loci tested. In yeasts, microsatellite instability increased as repetitive tracts became longer (Wierdl et al. 1997). This is the first study that reveals stability of microsatellite markers after successive generations of a spore-producing fungus exposed to different stresses. This knowledge is essential in interpreting data from population genetics studies, for instance to differentiate mutation from genetic exchange or

recombination. The stability in alleles at 7 microsatellite loci was also observed in the non-sporulating plant pathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* after 400 days of continuous *in vitro* hyphal growth (Kohn et al. 2008). The short term stability of polymorphic microsatellite marker profiles was also demonstrated in *Penicillium marneffeii* isolates after 7 to 8 weeks of serial culture in liquid media (Lasker and Ran 2004).

Moreover, even if *in vitro* serial generations of conidia of *B. cinerea* is probably different from what really happen in the nature, the number of generations realized in this study is realistic compared to the theoretical number of infection cycle produced by the fungus on its plant host during a growing season. Actually, *B. cinerea* is able to produce massive amount of spores in only 7 days of incubation under optimal conditions on different plant tissues (Nicot et al. 1996). Therefore, we can assume that microsatellite markers may be used with confidence as population genetics markers for this spore-producing fungus.

Meanwhile, some of the selective pressures tested in this study induced phenotypic changes in *B. cinerea* isolates, such as a resistance to pyrrolnitrin and to some fungicides, and a reduction in aggressiveness to tomato plants and apple fruits (G20P and G20I). The stability of the microsatellite markers combined with the phenotypic modifications illustrates the fact that different phenotypes could possess the same genotype. Moreover, the generations produced on PDA medium show that periodical transfer of isolates of *B. cinerea* to fresh medium, as commonly done in many laboratories, does not modify their microsatellite pattern. This stability is particularly important in population diversity studies when researchers test strains from collections that need to be regularly propagated on medium in the laboratory. To complement this study, the stability of microsatellites after successive cycles of sexual reproduction should be evaluated.

Acknowledgements

The authors wish to thank Claire Troulet and Gisèle Riqueau for excellent technical assistance.

References

- Ajouz S, Bardin M, Nicot PC, 2010. Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. *Plant Pathology* in press.
- Beever RE, Weeds PL, 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds), *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 29-52.

- Decognet V, Bardin M, Trottin-Caudal Y, Nicot PC, 2009. Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathology* 99: 185-193.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF, 1998. Rates of spontaneous mutations. *Genetics* 148: 1667-1686.
- Fournier E, Giraud T, Loiseau A, Vautrin D, Estoup A, Solignac M, Cornuet JM, Brygoo Y, 2002. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Molecular Ecology Notes* 2: 253-255.
- Ikeda K, Nakayashiki H, Takagi M, Tosa Y, Mayama S, 2001. Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Genetics and Genomics* 266: 318-325.
- Jarne P, Lagoda PJJ, 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 424-429.
- Jarvis WR, 1980. Epidemiology. In: Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR (eds), *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK, pp. 219-250.
- Karchani-Balma S, Gautier A, Raies A, Fournier E, 2008. Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology* 98: 1271-1279.
- Kohn LM, Schaffer MR, Anderson JB, Grunwald NJ, 2008. Marker stability throughout 400 days of in vitro hyphal growth in the filamentous ascomycete, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Genetics and Biology* 45: 613-617.
- Lasker BA, Ran Y, 2004. Analysis of polymorphic microsatellite markers for typing *Penicillium marneffeii* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1483-1490.
- Leroux P, Chapeland F, Desbrosses D, Gredt M, 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18: 687-697.
- Mes JJ, Haring MA, Cornelissen BJC, 2000. Foxy: an active family of short interspersed nuclear elements from *Fusarium oxysporum*. *Molecular and General Genetics* 263: 271-280.
- Nicot PC, Baille A, 1996. Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes. In: Morris CE, Nicot PC, Nguyen-The C (eds), *Aerial plant surface microbiology*. Plenum Press, New-York, pp. 169-189.
- Nicot PC, Mermier M, Vaissiere BE, Lagier J, 1996. Differential spore production by *Botrytis cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light-absorbing polyethylene film. *Plant Disease* 80: 555-558.

- Schug MD, Mackay TFC, Aquadro CF, 1997. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics* 15: 99-102.
- Vaczy KZ, Sandor E, Karaffa L, Fekete E, Arnyasi M, Czegledi L, Kovics GJ, Druzhinina IS, Kubicek CP, 2008. Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards. *Phytopathology* 98: 1312-1319.
- Weber JL, Wong C, 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123-1128.
- Wierdl M, Dominska M, Petes TD, 1997. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics* 146: 769-779.

Conclusion générale

Dans le domaine de la protection biologique, beaucoup d'efforts ont été réalisés ces dernières années pour la recherche de nouveaux agents de contrôle, l'étude de leurs facteurs d'efficacité, la compréhension de leur mode d'action et l'estimation de leur efficacité en conditions de cultures commerciales. En contrepartie, peu d'études ont été réalisées sur la durabilité de cette méthode de protection des cultures et en particulier sur le potentiel de contournement de la lutte biologique par des agents pathogènes. Cette étude tente d'apporter une contribution dans ce domaine. Une perte d'efficacité possible d'un agent de lutte biologique au champ peut résulter de la sélection d'isolats d'agents pathogènes préexistant dans les populations naturelles, avec une sensibilité réduite à l'agent de lutte biologique. Le contournement de l'efficacité d'agents de lutte biologique peut également survenir si l'agent pathogène a la possibilité de produire des mutants naturels ayant une sensibilité réduite à l'agent de lutte biologique, sous la pression de sélection exercée par l'utilisation du produit.

1. Estimation du risque de contournement de la lutte biologique

Au cours des travaux réalisés durant cette thèse, nous nous sommes focalisés sur la pyrrolnitrine, antibiotique anti-*Botrytis* produit par divers antagonistes bactériens. Pour cet antibiotique, nous avons établi, dans un premier temps, la sensibilité de base d'isolats de *B. cinerea*. Dans un second temps, nous avons estimé la possibilité d'évolution de la sensibilité de *B. cinerea* vis-à-vis de cet antibiotique. Les résultats obtenus ont été validés avec un antagoniste bactérien producteur de pyrrolnitrine.

Diversité de la sensibilité de B. cinerea à la pyrrolnitrine

Assez peu d'études s'intéressent à la distribution de la sensibilité des agents pathogène aux agents de lutte biologique (Yang *et al.*, 2008), alors que ce type d'étude est classiquement réalisé pour les fongicides, en particulier chez *B. cinerea* (Myresiotis *et al.*, 2008; Suty *et al.*, 1999; Lennox and Spotts, 2003). L'étude *in vitro* de la sensibilité d'une large collection d'isolats de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine a révélé que les 204 isolats de *B. cinerea* testés ne sont pas affectés de la même manière par l'antibiotique. Ce champignon présente une large gamme de sensibilité à la pyrrolnitrine: un facteur de 8,4X sépare l'isolat le moins sensible de l'isolat le plus sensible sur la base de la germination des spores. Le niveau de sensibilisé mesurée par les valeurs d'EC₅₀ de ces isolats ne suit pas une distribution normale. L'estimation du modèle de distribution le plus probable (par la méthode de 'model-based clustering') suggère que ces isolats sont subdivisés en 3 compartiments présentant des caractéristiques différentes de sensibilités. Il existe en particulier des isolats présentant une sensibilité significativement moindre à la pyrrolnitrine. *In vitro*, ces isolats produisent environ 10 fois

plus de spores que les isolats plus sensibles en présence de faibles doses de pyrrolnitrine ($10 \mu\text{g l}^{-1}$). D'autre part, la moindre sensibilité de ces isolats ne semble pas associée à une perte d'agressivité sur tomate. Ces résultats démontrent que des isolats moins résistants à la pyrrolnitrine et présentant un niveau de 'fitness' équivalent aux souches sensibles préexistant dans les populations naturelles de *B. cinerea*. Cet aspect mérite attention car il peut avoir des conséquences pratiques importantes dans le cas de l'utilisation d'agents de lutte biologiques producteurs de pyrrolnitrine.

Cependant, malgré cette diversité dans la sensibilité des isolats à l'antibiotique, un niveau équivalent de protection est obtenu pour toutes les souches de *B. cinerea* avec l'antagoniste bactérien producteur de pyrrolnitrine *P. chlororaphis* PhZ24. *Pseudomonas chlororaphis* PhZ24 contrôle presque à 100% le champignon sur la tomate. Les résultats obtenus par des tests de confrontation *in vitro* entre *B. cinerea* et *P. chlororaphis* PhZ24, confirme que la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* est inhibée de façon identique, quel que soit leur niveau de sensibilité à la pyrrolnitrine. Ces résultats suggèrent que les populations de *B. cinerea* sont efficacement contrôlées par des agents de lutte biologiques producteurs de pyrrolnitrine.

Cependant, la question de l'évolution possible de ces isolats vers une résistance plus grande lorsqu'ils seront soumis à la pression de sélection de traitements réalisés avec des agents de lutte biologiques producteurs de pyrrolnitrine se pose. L'établissement d'une ligne de base ('baseline') de sensibilité à la pyrrolnitrine sera donc utile dans le futur, pour suivre les modifications éventuelles de la sensibilité à cet antibiotique, et aux agents de lutte biologique le produisant, dans les populations naturelles de *B. cinerea*.

Evolution de B. cinerea vers une résistance élevée à la pyrrolnitrine

Afin d'évaluer une érosion possible de la sensibilité à la pyrrolnitrine chez *B. cinerea*, 10 générations successives ont été produites *in vitro* pour 5 isolats en présence d'une dose sub-létale de l'antibiotique (dose inhibant plus de 90% de la sporulation du champignon). Parmi les 5 isolats, un seul a évolué vers une moindre sensibilité à l'antibiotique, avec un facteur de résistance (FR) d'environ 10 entre l'isolat évolué et la souche parentale. La production de 10 générations supplémentaires pour 4 de ces isolats, avec des doses croissantes de pyrrolnitrine, a résulté dans le développement de variants (mutants) de *B. cinerea* ayant un fort niveau de résistance à l'antibiotique (FR > 1000). Ce niveau de résistance paraît stable en absence de pression de sélection. Les 4 isolats testés dans cette étude acquièrent un niveau semblable de résistance à la pyrrolnitrine quelque soit le phénotype des isolats parents d'origine. Ainsi les 4 isolats présentaient 3 phénotypes pour la résistance aux fongicides, BenS-ImiS (1 isolat), BenR1-ImiS (1), et BenS-ImiR1 (2). Ce résultat suggère que le développement

d'une résistance à la pyrrolnitrine chez *B. cinerea* est indépendant du profil original de résistance aux fongicides des isolats.

Ces mutants présentent également une sensibilité significativement réduite *in vitro* à l'antagoniste bactérien producteur de pyrrolnitrine, *P. chlororaphis* PhZ24. Ces travaux fournissent des évidences que *B. cinerea* est capable de développer rapidement et graduellement un haut niveau de résistance à la pyrrolnitrine et parallèlement une moindre sensibilité à un agent de lutte biologique producteur de pyrrolnitrine. Même si la réalisation de repiquage en série *in vitro* est probablement différente de ce qui peut réellement se passer dans la nature, le nombre de générations réalisées est réaliste par rapport au nombre théorique de cycles que le champignon peut faire sur sa plante hôte pendant une saison de culture (Nicot *et al.*, 2001; Holz *et al.*, 2004).

Cette résistance est cependant systématiquement associée à un fort coût adaptatif. Des différences significatives ont, en effet, été mises en évidence entre les générations résistantes à la pyrrolnitrine et les souches parentales sensibles, pour la croissance mycélienne et la sporulation mesurées *in vitro*, et l'agressivité sur pomme et sur plante de tomate. Cette réduction de 'fitness' laisse penser que ces isolats ne survivraient pas en conditions naturelles. Cette hypothèse est corroboré par le fait que des niveaux élevés de résistance au fludioxonil, analogue de structure de la pyrrolnitrine, sont rarement observés au champ chez *B. cinerea* (Baroffio *et al.*, 2003; Vignutelli *et al.*, 2002). En plus d'une réduction de la croissance mycélienne, les observations microscopiques ont révélées que la réduction d'agressivité sur plantes de tomate des mutants résistants à la pyrrolnitrine était liée à des changements structuraux des hyphes mycéliens. Chez le mutant résistant, l'extrémité des hyphes est arrondie et des structures ressemblant à des chlamydospores ont été observées dans les tissus de la plante. Ces différences pourraient expliquer en partie les différences de croissance mycélienne observées entre le mutant résistant et la souche sensible. Enfin d'autres différences morphologiques entre les mutants résistants à la pyrrolnitrine et les isolats parentaux sensibles ont été mises en évidence. La comparaison, en microscopie électronique à balayage, de la taille des spores montre que les spores des mutants résistants sont significativement plus petites que les spores sensibles (9,3 μm vs. 11,7 μm , $P < 0,0001$, données non présentées). Des études en microscopie électronique à transmission sont en cours pour explorer les modifications cellulaires éventuelles entre les deux types de cellules, en présence et en absence de pyrrolnitrine. Enfin, bien que ces mutants se développent sur le pétiole, ils ne traversent pas la zone d'abscission et n'infectent pas la tige de la plante. Ceci suggère que des mécanismes de défenses des plantes se mettent en place de façon efficace contre ces mutants dans cette zone.

En terme pratique, le développement d'isolats de *B. cinerea* avec une résistance élevée à la pyrrolnitrine dans les populations naturelles, si ça devait arriver, ne devrait donc pas nécessairement mettre en danger l'efficacité d'agents de lutte biologiques producteurs de pyrrolnitrine.

2. Mécanismes de résistance

Au cours de cette étude, au moins deux niveaux de résistance différents à la pyrrolnitrine ont été mis en évidence chez *B. cinerea*. Une résistance modérée correspondant aux isolats naturels collectés au champ et une résistance élevée correspondant aux isolats ayant subi des générations successives *in vitro* sous pression de sélection.

Rôle des transporteurs ABC dans la résistance modérée à la pyrrolnitrine des isolats naturels?

Le déterminisme moléculaire de résistance modérée à la pyrrolnitrine des isolats naturels n'a pas été étudié. Cependant des hypothèses peuvent être émises du fait des caractéristiques de résistance vis-à-vis des fongicides de ces isolats. Ces isolats présentent des résistances à un nombre significativement plus grand de fongicides que les isolats sensibles à la pyrrolnitrine. La moindre sensibilité observée à cet antibiotique semble donc être associée à une résistance à de multiples fongicides (MDR pour multidrug resistance). D'autre part, le niveau de résistance aux fongicides de ces isolats est modérée, ce qui semble être une caractéristique des isolats MDR décrits dans des études antérieures (Leroux, 2004). Les transporteurs ABC sont impliqués dans le caractère de résistance multiple aux fongicides et à d'autres métabolites d'origine naturelle (De Waard, 1997; Schoonbeek *et al.*, 2001; Schoonbeek *et al.*, 2002; Schouten *et al.*, 2002). Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent donc que les transporteurs ABC sont impliqués dans la résistance modérée à la pyrrolnitrine. Cependant, d'après Schoonbeek *et al.* (2002), un traitement de *B. cinerea* avec le fludioxonil, un fongicide dérivé de la pyrrolnitrine, a induit une forte expression du gène *BcatrB* de transporteur ABC alors qu'un traitement avec la pyrrolnitrine n'a pas induit l'expression de ce gène ni des autres gènes testés dans cette étude. Plus récemment, il a été montré que l'expression constitutive de *BcatrB* entraîne une résistance modérée au fludioxonil, mais pas à l'iprodione (Fillinger, communication personnelle). Ces résultats suggèrent une certaine sélectivité des transporteurs ABC.

Des travaux sont nécessaires pour déterminer le lien exact entre la résistance aux fongicides et à la pyrrolnitrine et le rôle des transporteurs ABC dans cette résistance chez *B. cinerea*. Parmi les perspectives, la corrélation entre la moindre sensibilité à la pyrrolnitrine et le caractère MDR des souches moins sensibles pourra être vérifiée sur un plus grand nombre d'isolats de *B. cinerea*. L'expression des gènes ABC en présence de pyrrolnitrine chez des souches modérément résistantes à

cet antibiotique pourra également être évaluée afin de tester la spécificité des transporteurs ABC. Enfin il serait intéressant de comparer l'évolution de ces isolats MDR sous une pression de sélection pyrrolnitrine par rapport à l'évolution des souches ImiS et ImiR1 réalisée au cours de cette étude.

Implication de l'histidine kinase dans la résistance forte à la pyrrolnitrine des mutants obtenus sur pression de sélection?

La résistance élevée à la pyrrolnitrine des 4 isolats sélectionnés sur cet antibiotique est systématiquement accompagnée d'une résistance au fongicide iprodione (dicarboximide). Réciproquement, les 5 isolats de *B. cinerea* issus du processus de sélection expérimentale sur l'iprodione acquièrent une résistance à la pyrrolnitrine en plus de la résistance acquise à l'iprodione. Dans le cas d'études réalisées en laboratoire sur des mutants de *B. cinerea* dont la résistance a été induite artificiellement par l'action d'une pression de sélection ou par des traitements mutagènes, la résistance croisée entre les dicarboximides et les phenylpyrroles, analogues de structures de la pyrrolnitrine, a été démontrée (Faretra and Pollastro, 1993; Hilber *et al.*, 1995; Leroux, 2004; Ziogas *et al.*, 2005). Mais alors que les 4 isolats sélectionnés sur la pyrrolnitrine présentent une résistance forte à l'iprodione, certains isolats sélectionnés sur l'iprodione ne présentent qu'une résistance modérée à la pyrrolnitrine. Ces résultats suggèrent que certains mécanismes de résistance vis à vis de ces molécules ne sont pas totalement similaires. Okada *et al.* (2005) ont également observé que des mutants résistants au fludioxonil pouvaient être inhibés par la pyrrolnitrine malgré la grande similitude structurale entre ces deux molécules.

Les mécanismes de résistance élevée de *B. cinerea* aux phenylpyrroles ont été largement étudiés chez *B. cinerea* (pour revue voir Leroux, 2004), révélant ainsi que la résistance à cette famille de fongicides est généralement associée à une résistance aux dicarboximides et aux hydrocarbures aromatiques. Des études moléculaires ont d'autre part montré qu'une histidine kinase osmosensible détermine la résistance à ces fongicides (Cui *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2002). Diverses mutations dans le gène *bos1* codant pour l'osmosensing class III histidine kinase chez *B. cinerea* ont été mises en évidence chez des mutants résistants aux fongicides (voir Chapitre 5, figure 2). Les gènes liés à la cascade MAP kinase ont également un rôle dans l'adaptation du champignon à des stress osmotiques et oxydatifs mais aussi dans son pouvoir pathogène (Viaud *et al.*, 2006). Tous les mutants sélectionnés sur pyrrolnitrine ou sur l'iprodione au cours de cette étude présentent une sensibilité accrue à la pression osmotique suggérant une anomalie dans la voie de transduction des signaux d'osmosensibilité.

Un certain nombre de mutations ponctuelles dans le gène *bos1* a été détecté au cours de cette étude. Ainsi l'analyse des 5 isolats parentaux révèle que le remplacement de l'isoleucine en position 365 par

la serine chez 2 isolats, aboutit à des résistances faibles aux dicarboximides sans résistance croisée avec les phenylpyrroles (phénotype ImiR1). Des études précédentes avaient également mis en évidence ce type de mutations, remplacement de l'isoleucine en position 365 par la serine, l'asparagine ou l'arginine pour des phénotypes ImiR1 (voir Chapitre 5, figure 2). Toutefois, pour certains mutants G20P ou G20I, cette mutation n'a pas été détectée malgré leur niveau élevé de résistance à l'iprodione (ImiR4). Le passage par cette mutation ne semble donc pas nécessaire pour acquérir un niveau de résistance élevé.

La combinaison de différentes mutations et le type de modifications observées, semblent impacter de façon différente le phénotype de résistance à la pyrrolnitrine et aux fongicides. Ces mutations aboutissent à la fois à une résistance à la pyrrolnitrine et à l'iprodione. Certaines semblent aboutir à une forte résistance à l'iprodione et une résistance modérée à la pyrrolnitrine. D'autre part, les résistances à la pyrrolnitrine et à l'iprodione ne sont pas systématiquement associées à une mutation ponctuelle dans le gène *Bos1*. C'est par exemple le cas de la souche H6. La comparaison des séquences de deux autres gènes (*Skn7* et *Sak1*), également impliqués dans la cascade de la MAP kinase, n'a pas révélé l'existence de mutations ponctuelles entre l'isolat sensible parentale et les mutants résistant à la pyrrolnitrine. Des études complémentaires sur les autres gènes impliqués dans cette cascade de signalisation sont nécessaires pour éclaircir le mécanisme de résistance à la pyrrolnitrine de cette souche de *B. cinerea*.

Enfin, des mutations similaires ont été mises en évidence dans différentes lignées d'un même isolat alors qu'elles sont systématiquement différentes entre isolats. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. Il peut être lié aux caractéristiques hétérocaryotiques de *B. cinerea* (Büttner *et al.*, 1994) : une mutation initialement présente dans un des noyaux d'un isolat donné pourrait être sélectionnée en présence de la pression de sélection. Dans notre cas, la pression de sélection exercée par la pyrrolnitrine et l'iprodione n'a pas systématiquement sélectionné des mutants identiques pour un même isolat (exemple des 3 lignées de BC1G20I), ce qui tend à invalider cette hypothèse. Une autre hypothèse serait que le contexte génétique de la cellule sélectionnerait préférentiellement une même mutation. Pour vérifier cette hypothèse, la comparaison de la séquence du gène *bos1* devra être réalisée sur de nombreux mutants d'un même isolat induits sur pyrrolnitrine ou sur iprodione.

Une conséquence pratique de ces résultats est que les traitements fongicides semblent pouvoir modifier le niveau de sensibilité de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine et par conséquent probablement aux agents de lutte biologiques producteurs de cet antibiotique.

Perspectives

1. Gain de 'fitness' des isolats résistants à la pyrrolnitrine?

Une question qui se pose est de savoir si des isolats ayant acquis un haut niveau de résistance peuvent retrouver une capacité de développement et un niveau d'agressivité plus élevés sur plantes. Malgré l'absence de développement de chancre sur la tige, les études de cytohistologie indiquent que les mutants résistants à la pyrrolnitrine sont capables de coloniser le fragment de pétiole de la tomate laissé sur la tige. Ils sont en outre capables de sporuler sur cette partie du végétal et donc de produire des descendants conidiens. Au cours d'une saison de culture d'une espèce végétale, cette sporulation peut permettre au mutant résistant d'accomplir plusieurs cycles d'infection-sporulation-dissémination sur sa plante hôte. La réalisation de ces générations successives sur la plante va-t-elle entraîner un gain d'agressivité chez ces mutants résistants ?

Ce phénomène de gain de 'fitness' a par exemple été observé chez le champignon filamentaire *Aspergillus nidulans* (Schoustra *et al.*, 2006). Dans ce cas, la résistance au fludioxonil avait induit un fort coût adaptatif. Des repiquages successifs en absence de pression de sélection sur milieu de culture *in vitro* a permis aux mutants résistants de retrouver un développement proche de la souche parentale (Schoustra *et al.*, 2006; Schoustra *et al.*, 2005). Des expériences similaires pourraient être réalisées avec les mutants de *B. cinerea* résistants à la pyrrolnitrine. Des générations successives pourraient également être réalisées sur plante.

Une autre perspective pourrait concerner l'étude du potentiel de gain de 'fitness' des mutants résistants *via* la reproduction sexuée. Bien que les apothécies soient rarement observées en conditions naturelles au champ, de récentes études de génétique des populations semblent indiquer que la reproduction sexuée est un phénomène plus important que généralement admis dans le cycle de développement de *B. cinerea* (voir Chapitre 1, paragraphe 1.4). De plus, la réalisation de croisements et la production d'ascospores sont des techniques maîtrisées en conditions de laboratoire. L'étude de descendants issus de croisements entre un mutant résistant à la pyrrolnitrine et une souche à agressivité élevée serait intéressante à réaliser.

2. Perte d'efficacité de la lutte biologique en pratique?

Les travaux réalisés au cours de cette étude ont été en conditions de laboratoire et ont montré la possibilité de développement d'une résistance à la pyrrolnitrine chez *B. cinerea*. L'acquisition de cette résistance est liée à un fort coût de 'fitness' suggérant que ce phénomène

a peu de chance de se produire en conditions de culture. Des essais sur des parcelles traitées avec un agent de lutte biologique producteur de pyrrolnitrine permettraient de suivre l'évolution au cours du temps de la sensibilité des isolats par rapport à la ligne de base définie dans cette étude. D'autre part, l'analyse génotypique des isolats dans ces parcelles et la comparaison avec des parcelles non traitées ou traitées avec des fongicides, permettrait de savoir si ce type de traitement favorise l'émergence et la sélection d'isolats spécifiques. Ces travaux pourraient également être étendus à d'autres agents de lutte biologique.

D'autre part, nos travaux ont montré que des traitements fongicides *in vitro* pouvaient favoriser le développement d'une résistance à la pyrrolnitrine et que les mécanismes de résistances étaient relativement similaires, impliquant les transporteurs ABC pour la résistance modérée et l'histidine kinase pour la résistance élevée à cet antibiotique. Dans ce cadre, différentes questions pourraient être abordées :

- Y'a-t-il un lien systématique entre la résistance modérée à la pyrrolnitrine et le caractère MDR des isolats ?
- Des traitements fongicides peuvent ils induire le développement d'une moindre sensibilité à des agents de lutte biologique producteurs de pyrrolnitrine en conditions de culture?
- Ces traitements fongicides ont-ils un effet sur le développement, chez *B. cinerea*, d'une résistance à d'autres antibiotiques produits par d'autres agents de lutte biologique ?

Enfin, il est maintenant admis qu'en dehors du contexte agricole, d'autres facteurs peuvent favoriser le développement de résistances à toutes sortes de molécules (Morris *et al.*, 2010). Il semble par exemple que les mécanismes de résistance à des composés toxiques d'origine naturelle soient universels chez les champignons (Coleman and Mylonakis, 2009). Ces mécanismes impliquent les transporteurs ABC et MFS et permettent aux champignons d'éliminer un grand nombre de ces composés. La résistance de *B. cinerea* à différentes molécules d'origine naturelle semble, par exemple, liée aux transporteurs ABC (Schoonbeek *et al.*, 2001; Schoonbeek *et al.*, 2002; Schouten *et al.*, 2008). *Botrytis cinerea* est un champignon saprophyte et peut survivre dans divers environnements, tels que le sol par exemple (Jarvis, 1977). La production de pyrrolnitrine est un trait largement distribué parmi différents genres bactériens ubiquistes dans le sol et des environnements associés aux plantes (Garbeva *et al.*, 2004). Ainsi *B. cinerea* peut interagir avec ces microorganismes et potentiellement développer des résistances à cet antibiotique. L'analyse de la résistance à la

pyrrolnitrine de différents isolats de *B. cinerea* provenant d'environnements divers, et en particulier du sol, pourrait fournir des informations à ce sujet. La résistance à d'autres molécules d'origine naturelle, en particulier des molécules produites par des agents de lutte biologiques ou indirectement par la plante suite à un traitement par un agent de lutte biologique (dans le cas d'une résistance induite), chez ces isolats pourraient également être évaluée.

3. Contournement d'agents de lutte biologique ayant d'autres modes d'action?

L'étude de la capacité d'adaptation de *B. cinerea* à des agents de lutte biologique agissant par d'autres modes d'action que l'antibiose, permettra, dans l'avenir, d'orienter les efforts de sélection d'antagonistes avec un mode d'action plus durable. Cette étude pourra être réalisée pour chaque mode d'action identifié chez les agents de lutte biologique anti-*Botrytis*, en répondant aux mêmes questions que celles posées au cours de mon travail de thèse, à savoir:

- Existe-t-il, dans les populations naturelles, des isolats de *B. cinerea* moins sensibles au mode d'action considéré?
- *Botrytis cinerea* est-il capable de devenir moins sensible à ce mode d'action lorsqu'il est soumis à une forte pression de sélection?

Du fait du peu de réserves énergétiques endogènes présentes dans les conidies de *B. cinerea*, les nutriments sont nécessaires à la germination des spores, au développement du mycélium, et à la formation des appressoria (voir Chapitre 1, paragraphe 1.5.1). Certains microorganismes (bactéries, levures, champignons filamenteux) peuvent ainsi inhiber la germination des conidies de *B. cinerea* via la compétition pour des éléments nutritifs comme l'azote, le carbone, ou des macro- ou micro-éléments présents dans le milieu. La réduction de la concentration en nutriments dans le milieu conduit généralement à un taux réduit de spores germées chez *B. cinerea* et à un ralentissement de la croissance mycélienne, réduisant ainsi le nombre d'infections et l'expansion des lésions (voir Chapitre 1, paragraphe 2.3.2). Cependant, la germination des spores dans l'eau en absence de nutriments a été observée chez certaines souches de *B. cinerea* (Blakeman, 1975). La germination de *B. cinerea* en absence de substances nutritives pourra être évaluée sur un grand nombre d'isolats. La relation entre la capacité de germination en absence de nutriments et une moindre sensibilité à la compétition nutritive sera alors estimée chez cet agent pathogène. D'autre part, des générations successives de *B. cinerea* pourraient être réalisées *in vitro* sur un milieu pauvre en nutriments

pour simuler la pression de sélection qu'exercerait un agent de lutte biologique agissant par compétition nutritive. La comparaison de paramètres de développement tel que la germination et la croissance du filament germinatif des souches évolués et des souches parentales pourra être évaluée *in vitro*.

La résistance induite chez la plante est un mode d'action de certains agents de protection biologique, en particulier contre *B. cinerea* (Chapitre 1, paragraphe 2.3.2.). Cette résistance peut s'établir de différentes façons chez la plante comme par exemple par la stimulation de voies métaboliques secondaires permettant la synthèse de substances antimicrobiennes telles que les phytoalexines. Les champignons phytopathogènes sont capables de contourner l'effet de molécules antifongiques produites par les plantes (Morrissey and Osbourn, 1999). Les transporteurs ABC et MFS semblent également jouer un rôle dans la protection de *B. cinerea* contre ces molécules (Coleman and Mylonakis, 2009). L'étude du potentiel de contournement d'un agent de lutte biologique inducteur de mécanismes de défense chez la plante, par *B. cinerea*, pourrait consister à tester la capacité de ce champignon à contourner l'effet de ces molécules de défense. Après avoir confirmé la présence de molécules antibiotiques induites chez les plantes traitées, l'objectif serait d'évaluer la résistance de *B. cinerea* vis-à-vis de ces molécules par un test d'inhibition de croissance par exemple.

D'autres modes d'actions pourraient être testés. Dans le cas de l'hyperparasitisme, par exemple, l'antagoniste est un parasite et reconnaît spécifiquement sa cible, pénètre dans ces cellules et entraîne sa destruction *via* la colonisation de ses organes. Les agents de lutte biologique hyperparasites sont généralement capables de produire des enzymes dégradant les parois cellulaires de l'agent pathogène, telles que des chitinases ou des β -1-3 glucanases (Chapitre 1, paragraphe 2.3.2). La résistance de *B. cinerea* aux enzymes dégradant la paroi des champignons pourra être évaluée.

L'évaluation de la durée d'efficacité d'une méthode de lutte est très difficile à prédire et très peu d'outils sont disponibles pour l'estimer. Il est donc délicat de prétendre qu'une méthode de lutte est non contournable. Ces études devraient toutefois faciliter le choix de solutions qui minimisent l'apparition et le maintien dans la population de souches responsables de la perte d'efficacité. Différents niveaux d'action sont possibles afin de favoriser la durabilité de cette méthode de protection des plantes: le choix du mécanisme d'action de l'agent de lutte biologique, sa gestion spatio-temporelle et les conditions de son utilisation. Le développement de nouveaux outils de sélection d'agents de lutte biologique avec un mode d'action plus

durable vis-à-vis de *B. cinerea* et une aide à l'orientation des efforts de sélection de nouveaux agents de lutte biologique sont également envisageables dans l'avenir.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ACTA. 2008. Index phytosanitaire 44 ed. ACTA, Paris, p. 844.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L.A., and Bessis, R. 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology* 23: 1689-1702.
- Adrian, M., Rajaei, H., Jeandet, P., Veneau, J., and Bessis, R. 1998. Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia. *Phytopathology* 88: 472-476.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant pathology*. Elsevier Academic Press, Oxford, UK, p. 922.
- Albertini, C., Thebaud, G., Fournier, E., and Leroux, P. 2002. Eburicol 14 [alpha]-demethylase gene (CYP51) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 106: 1171-1178.
- Alfonso, C., Raposo, R., and Melgarejo, P. 2000. Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology* 49: 243-251.
- Alyokhin, A., Baker, M., Mota-Sanchez, D., Dively, G., and Grafius, E. 2008. Colorado potato beetle resistance to insecticides. *American Journal of Potato Research* 85: 395-413.
- Arima, K., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuda, A., and Tamura, G. 1965. Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. I. Isolation and properties of pyrrolnitrin. *Journal of Antibiotics* 18: 201-204.
- Arima, K., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuta, A., and Tamura, G. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry* 28: 275-276.
- Asser-Kaiser, S., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Kienzle, J., Eberle, K.E., Gund, N.A., Reineke, A., Zebitz, C.P.W., Heckel, D.G., Huber, J., and Jehle, J.A. 2007. Rapid emergence of *Baculovirus* resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science* 317: 1916-1918.
- Baaren, P., Legendre, L., and Kan, J. 2004. Plant defence compounds against *Botrytis* infection, p. 143-161, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Balzi, E., and Goffeau, A. 1994. Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1187: 152-162.
- Bardin, M., Fargues, J., and Nicot, P.C. 2008. Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. *Biological Control* 46: 476-483.
- Baroffio, C.A., Siegfried, W., and Hilber, U.W. 2003. Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, and hydroxyanilide fungicides in Switzerland. *Plant Disease* 87: 662-666.
- Bautista-Banos, S., Hernandez-Lauzardo, A.N., Velazquez-del Valle, M.G., Hernandez-Lopez, M., Barka, E.A., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C.L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25: 108-118.
- Baysal, O., Caliskan, M., and Yesilova, O. 2008. An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 73: 25-32.
- Beever, R., and Weeds, P. 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*, p. 29-52, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Références bibliographiques

- Bélanger, R.R., and Deacon, J.W. 1996. Interaction specificity of the biocontrol agent *Sporothrix flocculosa*: a video microscopy study. *Phytopathology* 86: 1317-1323.
- Benyagoub, M., Rhlid, R.B., and Belanger, R.R. 1996. Purification and characterization of new fatty acids with antibiotic activity produced by *Sporothrix flocculosa*. *Journal of Chemical Ecology* 22: 405-413.
- Berling, M., Blachere-Lopez, C., Soubabere, O., Lery, X., Bonhomme, A., Sauphanor, B., and Lopez-Ferber, M. 2009. *Cydia pomonella* granulovirus genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 925-930.
- Bernard, J.L., and Bugaret, Y. 2002. Prophylaxie et mesures indirectes: clarifier les définitions pour mieux mettre en oeuvre la protection. *Phytoma-La Défense des Végétaux* 549: 14-19.
- Bhatt, D.D., and Vaughan, E.K. 1962. Preliminary investigations on biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*) of strawberries. *Plant Disease Reporter* 46: 342-345.
- Blakeman, J.P. 1972 Effect of plant age on inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on beetroot leaves. *Physiological Plant Pathology* 2: 143-152.
- Blakeman, J.P. 1975. Germination of *Botrytis cinerea* conidia *in vitro* in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. *Transactions of the British Mycological Society* 65: 239-247.
- Blakeman, J.P. 1980. Behaviour of conidia on aerial plant surfaces, p. 115-151, in: *The biology of Botrytis*. J. R. Coley-smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London, UK.
- Blakeman, J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control, p. 6-30, in: *Biological control on the phylloplane*. C. E. Windels and S. E. Lindow, eds. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN, USA.
- Blakeman, J.P. 1993. Pathogens in the foliar environment. *Plant Pathology* 42: 479-493.
- Blakeman, J.P., and Fokkema, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology* 20: 167-190.
- Blakeman, J.P., and Fraser, A.K. 1971. Inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on the surface. *Physiological Plant Pathology* 1: 45-54.
- Blakeman, J.P., and Szejnberg, A. 1974. Germination of *Botrytis cinerea* spores on beetroot leaves treated with antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 62: 537-545
- Bocquet, F., Moncomble, D., and Valade, M. 1995. Etat sanitaire de la vendange et qualité des vins. *Le Vigneron Champenois* 7/8: 15-23.
- Bocquet, F., Moncomble, D., and Valade, M. 1996. Raisins botrytisés: adapter le fractionnement des jus lors du pressurage. *Le Vigneron Champenois* 9: 15-24.
- Bolay, A., and Pezet, R. 1987. Problèmes actuels de la lutte contre les maladies de la vigne. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 19: 21-24.
- Bollen, G.J., and Scholten, G. 1971. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *European Journal of Plant Pathology* 77: 83-90.
- Brent, K.J., and Hollomon, D.W. 1998. Fungicide resistance: the assessment of risk, p. 1-48, in: *FRAC Monograph*. Global Crop Protection Federation, Brussels, Belgium.
- Breuil, A.-C., Jeandet, P., Adrian, M., Chopin, F., Pirio, N., Meunier, P., and Bessis, R. 1999. Characterization of a pterostilbene dehydrodimer produced by laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 89: 298-302.
- Bridge, P., Couteaudier, Y., and Clarkson, J. 1998. *Molecular variability of fungal pathogens*. CAB International, Wallingford, UK, p. 319.

- Brodie, I.D.S., and Blakeman, J.P. 1975. Competition for carbon compounds by a leaf surface bacterium and conidia of *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology* 6: 125-135.
- Brunel, E., and Fournet, S. 2002. Protection biologique et intégrée contre la mouche du chou (*Delia radicum* L.): de la recherche fondamentale à l'expérimentation de plein champs, pp. 276-282. 2ème conférence internationale sur les moyens alternatifs de lutte contre les organismes nuisibles aux végétaux Lille, France, 2002/03/4-7.
- Brygoo, Y., Caffier, V., Carlier, J., Fabre, J.V., Fernandez, D., Giraud, T., Mourichon, X., Neema, C., Notteghem, J.L., Pope, C., Tharreau, D., and Lebrun, M.H. 1998. Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi., p. 133-146, in: Molecular variability of fungal pathogens. P. Bridge, Y. Couteaudier and J. Clarkson, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Buck, J.W., and Jeffers, S.N. 2004. Effect of pathogen aggressiveness and vinclozolin on efficacy of *Rhodotorula glutinis* PM4 against *Botrytis cinerea* on geranium leaf disks and seedlings. *Plant Disease* 88: 1262-1268.
- Bunster, L., Fokkema, N.J., and Schippers, B. 1989. Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1340-1345.
- Burrage, S.W. 1971. The micro-climate at the leaf surface p. 91-101, in: Ecology of leaf surface microorganisms. T. E. Preece and C. H. Dickinson, eds. Academic Press, London, UK.
- Burse, A., Weingart, H., and Ullrich, M.S. 2004. NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in *in vitro* competition with other epiphytic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 693-703.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B., and Tudzynski, P. 1994 Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics* 25: 445-50.
- Calvente, V., de Orellano, M.E., Sansone, G., Benuzzi, D., and Sanz de Tosetti, M.I. 2001. Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 226-229.
- Carlen, C., Faby, R., Karjalainen, R., Pommier, J.J., and Steffek, R. 2003. Control of air borne diseases in strawberries with natural and synthetic elicitors. *Acta Horticulturae* 649: 237-240.
- Cartwright, D.K., Chilton, W.S., and Benson, D.M. 1995. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 211-216.
- Chernin, L., Brandis, A., Ismailov, Z., and Chet, I. 1996. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Current Microbiology* 32: 208-212.
- Choi, W.Y., Park, H.J., Ahn, D.J., Lee, J., and Lee, C.Y. 2002. Wettability of chitosan coating solution on fuji apple skin. *Journal of Food Science* 67: 2668-2672.
- Cilindre, C., Castro, A.J., Clément, C., Jeandet, P., and Marchal, R. 2007. Influence of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine proteins (characterized by two-dimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. *Food Chemistry* 103: 139-149.
- Clark, C.A., and Lorbeer, J.W. 1977. Comparative nutrient dependency of *Botrytis squamosa* and *Botrytis cinerea* for germination of conidia and pathogenicity on onion leaves. *Phytopathology* 67: 212-218.
- Coleman, J.J., and Mylonakis, E. 2009. Efflux in fungi: la pièce de résistance. *PLoS Pathogens* 5: e1000486.

Références bibliographiques

- Coley-Smith, J.R. 1980. Sclerotia and other structures in survival, p. 85-114, in: The biology of *Botrytis*. J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London, UK.
- Coley-Smith, J.R., and Cooke, R.C. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology* 9: 65-92.
- Cook, R.J., and Barker, K.F. 1984. The nature and practice of biological control of plant pathogens, APS Press, St. Paul, MN, p. 539.
- Cooksey, D.A., and Moore, L.W. 1982. High frequency spontaneous mutations to Agrocin 84 resistance in *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiological Plant Pathology* 20: 129-&.
- Corbaz, R. 1993. Résistance aux fongicides de *Botrytis cinerea* isolé de cultures maraîchères. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 24: 233-236.
- Couderchet, M. 2003. Benefits and problems of fungicide control of *Botrytis cinerea* in vineyards of Champagne. *Vitis* 42: 165-171.
- Creasy, L.L., and Creasy, M.T. 1998. Grape chemistry and the significance of resveratrol: an overview. *Pharmaceutical Biology* 36: 8-13.
- Cui, W., Beever, R.E., Parkes, S.L., and Templeton, M.D. 2004. Evolution of an osmosensing histidine kinase in field strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in response to dicarboximide fungicide usage. *Phytopathology* 94: 1129-1135.
- Cui, W., Beever, R.E., Parkes, S.L., Weeds, P.L., and Templeton, M.D. 2002. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genetics and Biology* 36: 187-198.
- Cutter, E.G. 1976. Aspects of the structure and development of the aerial surfaces of higher plants, p. 1-40, in: *Microbiology of aerial plant surfaces*. C. H. Dickinson and T. F. Preece, eds. Academic Press, London, UK.
- Daugaard, H., Sorensen, L., and Loschenkohl, B. 2003. Effect of plant spacing, nitrogen fertilisation, post-harvest defoliation and finger harrowing in the control of *Botrytis cinerea* Pers. in strawberry. *European Journal of Horticultural Science* 68: 77-82.
- Davidson, J.A., and Krysinska-Kaczmarek, M. 2007. Effects of inoculum concentration, temperature, plant age and interrupted wetness on infection of lentil (*Lens culinaris*) by *Botrytis* spp. conidia. *Australasian Plant Pathology* 36: 389-396.
- De Capdeville, G., Maffia, L.A., Finger, F.L., and Batista, U.G. 2005. Pre-harvest calcium sulfate applications affect vase life and severity of gray mold in cut roses. *Scientia Horticulturae* 103: 329-338.
- De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., and Höfte, M. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 104: 279-286.
- De Meyer, G., and Hofte, M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87: 588-593.
- de Souza, J.T. 2002. Distribution, diversity, and activity of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp, University of Wageningen, The Netherlands, p. 173
- de Souza, J.T., and Raaijmakers, J.M. 2003. Polymorphisms within the *prnD* and *pltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 21-34.
- de Souza, J.T., Arnould, C., Deulvot, C., Lemanceau, P., Gianinazzi-Pearson, V., and Raaijmakers, J.M. 2003. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology* 93: 966-975.

Références bibliographiques

- De Waard, M.A. 1997. Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. *Pesticide Science* 51: 271-275.
- Decognet, V., Bardin, M., Trottin-Caudal, Y., and Nicot, P.C. 2009a. Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathology* 99: 185-193.
- Decognet, V., Nicot, P., Trottin-Caudal, Y., and Fournier, C. 1997. Biocontrol of *Botrytis cinerea* stem infection on greenhouse tomatoes with an antagonistic strain of *Fusarium*, pp. 695-699. 10th congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Montpellier, France, 1997/06/1-5.
- Decognet, V., Ravetti, F., Martin, C., and Nicot, P.C. 2009b. Improved leaf pruning reduces development of stem cankers caused by grey mould in greenhouse tomatoes. *Agronomy for Sustainable Development*: in press.
- Decoin, M., Whipps, J.M., Nicot, P., Gullino, M.L., and Spadaro, D. 2002. Micro-organismes contre agents pathogènes. *Phytoma-La Défense des Végétaux* 549: 32-36.
- Del Sorbo, G., Schoonbeek, H.J., and De Waard, M.A. 2000. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology* 30: 1-15.
- Delcán, J., and Melgarejo, P. 2002. Mating behaviour and vegetative compatibility in spanish populations of *Botryotinia fuckeliana*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 391-400.
- Dik, A.J., and Elad, Y. 1999. Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. *European Journal of Plant Pathology* 105: 123-137.
- Dik, A.J., and Wubben, J.P. 2004. Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses, p. 319-331, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Dirolez, A., Marches, F., Fortini, D., and Brygoo, Y. 1995. Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 103-108.
- Doehlemann, G., Berndt, P., and Hahn, M. 2006. Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. *Microbiology* 152: 2625-2634.
- Doehlemann, G., Molitor, F., and Hahn, M. 2005. Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 601-610.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., and Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52: 137-145.
- Duffy, B., Schouten, A., and Raaijmakers, J.M. 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41: 501-538.
- Eberle, K.E., and Jehle, J.A. 2006. Field resistance of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) is autosomal and incompletely dominant inherited. *Journal of Invertebrate Pathology* 93: 201-206.
- Edwards, S.G., and Seddon, B. 1992. *Bacillus brevis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected chinese cabbage, p. 267-271, in: *Recent advances in Botrytis research*. K. Verhoeff, N. E. Malathrakakis and B. Williamson, eds. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Edwards, S.G., and Seddon, B. 2001. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology* 91: 652-659.

Références bibliographiques

- El-Banna, N., and Winkelmann, G. 1998. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *Journal of Applied Microbiology* 85: 69-78.
- El-Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., and Benhamou, N. 1997. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology* 12: 183-194.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Brown, G.E., Ippolito, A., and Wilson, C.L. 2001. Control of decay of apple and citrus fruits in semicommercial tests with *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Biological Control* 20: 96-101.
- Elad, Y. 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology* 102: 719-732.
- Elad, Y. 1997. Effect of filtration of solar light on the production of conidia by field isolates of *Botrytis cinerea* and on several diseases of greenhouse-grown vegetables. *Crop Protection* 16: 635-642.
- Elad, Y., and Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 105: 177-189.
- Elad, Y., and Kirshner, B. 1992. Establishment of an active *Trichoderma* population in the phylloplane and its effect on grey mould (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica* 20: S137-S141.
- Elad, Y., Köhl, J., and Fokkema, N.J. 1994a. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology* 100: 315-336.
- Elad, Y., Malathrakis, N.E., and Dik, A.J. 1995. Biological control of *Botrytis* incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. *Crop Protection* 15: 224-240.
- Elad, Y., Shtienberg, D., and Niv, A. 1994b. *Trichoderma harzianum* T39 integrated with fungicides: improved biocontrol of grey mould, p. 1109-1113, in: Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases 1994, Vol. 3. British Crop Protection Council, Farnham, UK.
- Elad, Y., and Stewart, A. 2004. Microbial control of *Botrytis* spp, p. 223-241, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Elad, Y., and Volpin, H. 1993. Reduced development of grey mould (*Botrytis cinerea*) in bean and tomato plants by calcium nutrition. *Journal of Phytopathology* 139: 146-156.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N. 2004. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - an introduction, p. 1-6, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Elad, Y., and Yunis, H. 1993. Effect of microclimate and nutrients on development of cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica* 21: 257-268.
- Elad, Y., Yunis, H., and Katan, T. 1992a. Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathology* 41: 41-46.
- Elad, Y., Yunis, H., and Volpin, H. 1992b. Effect of nutrition on susceptibility of cucumber, eggplant and pepper crops to *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany* 71: 602-608.
- Elad, Y., Zimand, G., Zaq, Y., Zuriel, S., and Chet, I. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology* 42: 324-332.

Références bibliographiques

- Elmer, P.A.G., and Michailides, T.J. 2004. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops, p. 243-272, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Elmer, P.A.G., and Reglinski, T. 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* 55: 155-177.
- Epton, H.A.S., and Richmond, D.V. 1980. Formation, structure and germination of conidia, p. 41-83, in: *The biology of Botrytis*. J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London, UK.
- Errakhi, R., Lebrihi, A., and Barakate, M. 2009. *In vitro* and *in vivo* antagonism of actinomycetes isolated from moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii*: a causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Applied Microbiology* 107: 672-681.
- Faretra, F., and Antonacci, E. 1987. Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopathologia Mediterranea* 26: 29-35.
- Faretra, F., Antonacci, E., and Pollastro, S. 1988. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* 134: 2543-2550.
- Faretra, F., and Pollastro, S. 1991. Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* 95: 943-951.
- Faretra, F., and Pollastro, S. 1993. Isolation, characterization, and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to the phenylpyrrole fungicide CGA 173506. *Mycological Research* 97: 620-624.
- Faretra, F., Pollastro, S., and Di Tonno, A.P. 1989. New natural variants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) coupling benzimidazole-resistance to insensitivity toward the N-phenylcarbamate diethofencarb. *Phytopathologia Mediterranea* 28: 98-104.
- Filonow, A.B. 1998. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Science and Technology* 8: 243-256.
- Finkers, R., Bai, Y.L., van den Berg, P., van Berloo, R., Meijer-Dekens, F., ten Have, A., van Kan, J., Lindhout, P., and van Heusden, A.W. 2008. Quantitative resistance to *Botrytis cinerea* from *Solanum neorickii*. *Euphytica* 159: 83-92.
- Fournier, E., and Giraud, T. 2008. Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 122-132.
- Fournier, E., Giraud, T., Albertini, C., and Brygoo, Y. 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97: 1251-1267.
- Fournier, E., Giraud, T., Loiseau, A., Vautrin, D., Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J.M., and Brygoo, Y. 2002. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Molecular Ecology Notes* 2: 253-255.
- Fournier, E., Levis, C., Fortini, D., Leroux, P., Giraud, T., and Brygoo, Y. 2003. Characterization of *Bc-hch*, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* *het-c* vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. *Mycologia* 95: 251-261.
- Fravel, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.
- Friedman, M. 2002. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5751-5780.

Références bibliographiques

- Fritsch, E., Undorf-Span, K., Kienle, J., Zebitz, C.P.W., and Huber, J. 2005. Apfelwickler granulovirus: erste hinweise auf unterschiede in der empfindlichkeit lokaler apfelwickler-populationen. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 57: 29-34.
- Fruit, L. 2001. Etude des facteurs d'efficacité d'un agent de lutte biologique (*Ulocladium atrum*) pour la protection des plaies d'effeuillage sur tomate contre *Botrytis cinerea*, Université de Claude Bernard-Lyon 1, Lyon, France, p. 123.
- Garbeva, P., Voesenek, K., and van Elsas, J.D. 2004. Quantitative detection and diversity of the pyrrolnitrin biosynthetic locus in soil under different treatments. Soil Biology & Biochemistry 36: 1453-1463.
- Georgopoulos, S.G. 1977. Development of fungal resistance to fungicides, p. 439-495, in: Antifungal compounds. M. R. Siegel and H. D. Sisler, eds. Dekker, New York.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K., and Brygoo, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. Phytopathology 89: 967-973.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., and Brygoo, Y. 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. Molecular and Biological Evolution 14: 1177-1185.
- Groves, J.W., and Drayton, F.L. 1939. The perfect stage of *Botrytis cinerea*. Mycologia 31: 485-489.
- Guetsky, R., Elad, Y., Shtienberg, D., and Dinoor, A. 2002. Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guillermondii* and *Bacillus mycooides* applied as a mixture on strawberry plants. Biocontrol Science and Technology 12: 705-714.
- Gulati, M.K., Koch, E., and Zeller, W. 1999. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by fluorescent *Pseudomonas*, antagonist of red core disease of strawberry, p. 437-444, in: Modern fungicides and antifungal compounds, Vol. 2. H. Lyr, P. E. Russell, H. W. Dehne and H. D. Sisler, eds. Intercept LTD publishers, Andover, England.
- Gullino, M.L. 1992. Chemical control of *Botrytis* spp, p. 217-222, in: Recent advances in *Botrytis* research. K. Verhoeff, N. E. Malathrakis and B. Williamson, eds. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Gurusiddaiah, S., Weller, D.M., Sarkar, A., and Cook, R.J. 1986. Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 29: 488-495.
- Haas, D., and Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology 41: 117-153.
- Haggag, W.M. 2008. Isolation of bioactive antibiotic peptides from *Bacillus brevis* and *Bacillus polymyxa* against *Botrytis* grey mould in strawberry. Archives of Phytopathology and Plant Protection 41: 477-491.
- Hammer, P.E., Burd, W., Hill, D.S., Ligon, J.M., and van Pee, K.H. 1999. Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. FEMS Microbiology Letters 180: 39-44.
- Hammer, P.E., Evensen, K.B., and Janisiewicz, W.J. 1993. Postharvest control of *Botrytis cinerea* on cut rose flowers with pyrrolnitrin. Plant Disease 77: 283-286.
- Hammer, P.E., Hill, D.S., Lam, S.T., Van Pee, K.H., and Ligon, J.M. 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. Applied and Environmental Microbiology 63: 2147-2154.

Références bibliographiques

- Handelsman, J., and Stabb, E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* 8: 1855-1869.
- Hart, J.H. 1981. Role of phytoalexins in decay and disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 19: 437-458.
- Hawker, L. 1950. *Physiology of fungi*. University of London Press, London, UK, p. 360.
- Hayashi, K., Schoonbeek, H.J., and De Waard, M.A. 2002. Bcmfs1, a novel major facilitator superfamily transporter from *Botrytis cinerea*, provides tolerance towards the natural toxic compounds camptothecin and cercosporin and towards fungicides. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4996-5004.
- Hennebert, G.L. 1973. *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia* 7: 183-204.
- Hilber, U.W., Schwinn, F.J., and Schuepp, H. 1995. Comparative resistance patterns of fludioxonil and vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*. *Journal of Phytopathology* 143: 423-428.
- Hobbs, E.L., and Waters, W.E. 1964. Influence of nitrogen and potassium on susceptibility of *Chrysanthemum morifolium* to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 54: 674-676.
- Hoffland, E., van Beusichem, M.L., and Jeger, M.J. 1999. Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. *Plant and Soil* 210: 263-272.
- Holt, R.D., and Hochberg, M.E. 1997. When is biological control evolutionarily stable (or is it)? *Ecology* 78: 1673-1683.
- Holz, G., Coertze, S., and Williamson, B. 2004. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces, p. 9-27, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Hoos, G., and Blaich, R. 1990. Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *Journal of Phytopathology* 129: 102-110.
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.
- Jacobsen, B.J. 2006. Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents, p. 133-147, in: *Microbial ecology of aerial plant surfaces*. M. J. Bailey, A. K. Lilley, T. M. Timms-Wilson and P. T. N. Spencer-Phillips, eds. Atheneum Press, Gateshead, UK.
- Janisiewicz, W., Yourman, L., Roitman, J., and Mahoney, N. 1991. Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease* 75: 490-494.
- Janisiewicz, W.J. 1998. Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits - challenges and opportunities, p. 171-198, in: *Plant-microbe interactions and biological control*. G. J. Boland and L. D. Kuykendall, eds. Marcel Dekker Inc., NY, USA.
- Janisiewicz, W.J., Peterson, D.L., and Bors, R. 1994. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Disease* 78: 466-470.
- Jarvis, W.R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: Taxonomy, Physiology, and Pathogenicity. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada, p. 195.
- Jarvis, W.R. 1980. Epidemiology, p. 219-50, in: *The biology of Botrytis*. J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London, UK.
- Jarvis, W.R. 1992. Managing diseases in greenhouse crops. *American Phytopathological Society*, St Paul, MN, p. 288.
- Jeandet, P., Adrian, M., Breuil, A.C., Sbaghi, M., Debord, S., Bessis, R., Weston, L.A., and Harmon, R. 2000. Chemical induction of phytoalexin synthesis in grapevines:

- application to the control of grey mould in the vineyard. *Acta Horticulturae* 528: 591-596.
- Jeandet, P., Adrian, M., Joubert, J.M., Hubert, F., and Bessis, R. 1996. Stimulating the natural defences of grape. A complement to phytosanitary control of *Botrytis*. *Phytoma-La Défense des Végétaux* 488: 21-25.
- Johnson, R. 1979. The concept of durable resistance. *Phytopathology* 69: 198-199.
- Johnson, R. 1981. Durable resistance: definition of genetic control and attainment in plant breeding. *Phytopathology* 71: 567-568.
- Jones, R.W., and Hancock, J.G. 1988. Mechanism of gliotoxin action and factors mediating gliotoxin sensitivity. *Journal of General Microbiology* 134: 2067-2075.
- Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I., and Chernin, L. 2003. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 323-331.
- Kapat, A., Zimand, G., and Elad, Y. 1998a. Biosynthesis of pathogenicity hydrolytic enzymes by *Botrytis cinerea* during infection of bean leaves and *in vitro*. *Mycological Research* 102: 1017-1024.
- Kapat, A., Zimand, G., and Elad, Y. 1998b. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 127-137.
- Karchani-Balma, S., Gautier, A., Raies, A., and Fournier, E. 2008. Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology* 98: 1271-1279.
- Katan, T., Elad, Y., and Yunis, H. 1989. Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 38: 86-92.
- Keller, M., Viret, O., and Cole, F.M. 2003. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology* 93: 316-322.
- Kirner, S., Hammer, P.E., Hill, D.S., Altmann, A., Fischer, I., Weislo, L.J., Lanahan, M., van Pee, K.H., and Ligon, J.M. 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology* 180: 1939-1943.
- Klarzynski, O., and Fritig, B. 2001. Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 324: 953-963.
- Kochenko. 1972. Features of sclerotial germination of *Botrytis cinerea* Fr. *Mykologia Fitopatologia* 6: 256-258.
- Köhl, J., and Fokkema, N.J. 1993. Fungal interactions on living and necrotic leaves, p. 321-334, in: *Ecology of plant pathogens*. J. P. Blakeman and B. Williamson, eds. CABI, UK.
- Köhl, J., Gerlagh, M., De Haas, B.H., and Krijger, M.C. 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. *Phytopathology* 88: 568-575.
- Köhl, J., Lombaers-van der Plas, C.H., Molhoek, W.M.L., Kessel, G.J.T., and Goossen-Van Der Geijn, H.M. 1999. Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favourable for *Botrytis* spp. development. *BioControl* 44: 329-346.
- Korolev, N., Mamiev, M., Zahavi, T., and Elad, Y. 2009. Resistance to fungicides among *Botrytis cinerea* isolates from tomato and other hosts in Israel. *Acta Horticulturae* 808: 367-376.
- Kosuge, T., and Hewitt, W.B. 1964. Exudates of grape berries and their effect on germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 54: 167-172.

Références bibliographiques

- Kowalski, S.P., Domek, J.M., Sanford, L.L., and Deahl, K.L. 2000. Effect of alpha-tomatine and tomatidine on the growth and development of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): studies using synthetic diets. *Journal of Entomological Science* 35: 290-300.
- Kretschmer, M., Kassemeyer, H.H., and Hahn, M. 2007. Age-dependent grey mould susceptibility and tissue-specific defence gene activation of grapevine berry skins after infection by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 155: 258-263.
- Latorre, B.A., Agosín, E., San Martín, R., and Vásquez, G.S. 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection* 16: 209-214.
- Latorre, B.A., Spadaro, I., and Rioja, M.E. 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection* 21: 957-961.
- Legard, D.E., Xiao, C.L., Mertely, J.C., and Chandler, C.K. 2000. Effects of plant spacing and cultivar on incidence of *Botrytis* fruit rot in annual strawberry. *Plant Disease* 84: 531-538.
- Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigee, D., Epton, H.A.S., and Harbour, A. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* Cl27 and *Bacillus pumilus* Cl45. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 97-108.
- Lennox, C.L., and Spotts, R.A. 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* 87: 645-649.
- Lepoivre, P. 2003. *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. De Boeck Université, Bruxelles, Belgium, p. 432.
- Leroux, P. 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides, p. 195-222, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., and Gredt, M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from french vineyards. *Crop Protection* 18: 687-697.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., and Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* 58: 876-888.
- Leroux, P., and Moncomble, D. 1993. Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne. *Passé, présent, futur (2^e partie)*. *Phytoma-La Défense des Végétaux* 451: 23-27.
- Levis, C., Fortini, D., and Brygoo, Y. 1997. Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Molecular and General Genetics* 254: 674-680.
- Levy, E., Eyal, Z., Chet, I., and Hochman, A. 1992. Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40: 163-171.
- Li, G.Q., Huang, H.C., Acharya, S.N., and Erickson, R.S. 2004. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. *Plant Disease* 88: 1246-1251.
- Li, H., and Leifert, C. 1994. Development of resistance in *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Whetzel against the biological control agent *Bacillus subtilis* CL27. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101: 414-418.
- Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R., Pacifica, S., and De Cicco, V. 1998. Additives and natural products against post harvest pathogens compatibility with antagonistic yeasts. *Journal of Plant Pathology* 80: 259.

Références bibliographiques

- Liu, W. 2008. Caractérisation de la cascade de signalisation osmotique "os" chez *Botrytis cinerea*, University of Paris-Sud XI, Orsay, France p. 201.
- Liu, W., Leroux, P., and Fillinger, S. 2008. The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole-resistance. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1062-1074.
- Lorbeer, J.W., Seyb, A.M., de Boer, M., and van den Ende, J.E. 2004. *Botrytis* species on bulb crops, p. 273-294, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Lorenz, D.H., and Eichhorn, K.W. 1983. Investigations on *Botryotinia fuckeliana* Whetz., the perfect stage of *Botrytis cinerea* Pers. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 90: 1-11.
- Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L., and Pietro, A.d. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- Mackie, A.E., and Wheatley, R.E. 1999. Effects and incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 375-385.
- Magee, J.B., J., S.B., and Rimando, A. 2002. Resveratrol content of muscadine berries is affected by disease control spray program. *HortScience* 37: 358-361.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., and Legendre, L. 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 359-366.
- Marcucci, M.C. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83-99.
- Mari, M., Bertolini, P., and Pratella, G.C. 2003. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology* 94: 761-766.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., and Fermaud, M. 2003. Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 479-488.
- Martinez, F., Dubos, B., and Fermaud, M. 2005. The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* 95: 692-700.
- Mazzola, M., Fujimoto, D.K., Thomashow, L.S., and Cook, R.J. 1995. Variation in sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of take-all of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2554-2559.
- McDonald, B.A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448-453.
- McDonald, B.A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349-379.
- McGaughey, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229: 193-195.
- McGaughey, W.H., and Whalon, M.E. 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 258: 1451-1455.
- McHugh, R., and Seddon, B. 2001. Mode of action of *Brevibacillus brevis*- biocontrol and biorational control. *Bulletin OILB/SROP* 24: 17-20.
- McLaughlin, R.J., Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., and Chalutz, E. 1990. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. *Phytopathology* 80: 456-461.

Références bibliographiques

- Mercier, J., and Wilson, C.L. 1994. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological Control* 4: 138-144.
- Meziane, H., Gavriel, S., Ismailov, Z., Chet, I., Chernin, L., and Höfte, M. 2006. Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action. *Postharvest Biology and Technology* 39: 125-133.
- Milner, J.L., SiloSuh, L., Lee, J.C., He, H.Y., Clardy, J., and Handelsman, J. 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3061-3065.
- Mirzaei, S., Mohammadi-Goltapeh, E., Shams-Bakhsh, M., Safaie, N., and Chaichi, M. 2009. Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. *Journal of Phytopathology* 157: 474-482.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., and Moselio, S. 2009. Pesticides, microbial, p. 110-120, in: *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press, Oxford, UK.
- Moorman, G.W., and Lease, R.J. 1992. Benzimidazole and dicarboximide resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. *Plant Disease* 76: 477-480.
- Morris, C.E., Bardin, M., Kinkel, L.L., Moury, B., Nicot, P.C., and Sands, D.E. 2010. Expanding the paradigms of plant pathogen life history and evolution of parasitic fitness beyond agricultural boundaries. *PLoS Pathogens*: in press.
- Morrissey, J.P., and Osbourn, A.E. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 708-724.
- Mouren, D. 1999. Méthodes de lutte contre le *Botrytis* sur la tomate. *PHM Revue Horticole* 399: 42-44.
- Moyano, C., Gomez, V., and Melgarejo, P. 2004. Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *Journal of Phytopathology* 152: 484-490.
- Muñoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y., and Giraud, T. 2002. Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research* 106: 594-601.
- Myresiotis, C.K., Bardas, G.A., and Karaoglanidis, G.S. 2008. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Disease* 92: 1427-1431.
- Myresiotis, C.K., Karaoglanidis, G.S., and Tzavella-Monari, K. 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* 91: 407-413.
- Nair, N.G., and Allen, R.N. 1993. Infection of grape flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature. *Mycological Research* 97: 1012-1014.
- Nelson, M.E., and Powelson, M.L. 1988. Biological control of gray mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. *Plant Disease* 72: 727-729.
- Newhook, F.J. 1951. Microbiological control of *Botrytis cinerea* Pers. II. Antagonism by fungi and *actinomyces*. *Annals of Applied Biology* 38: 169-184.
- Newhook, F.J. 1957. The relationship of saprophytic antagonism to control of *Botrytis cinerea* Pers. on tomatoes. *New Zealand Journal of Science and Technology* 38: 473-481.
- Nicot, P.C., and Baille, A. 1996. Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes, p. 169-189, in: *Aerial plant surface microbiology*. C. E. Morris, P. C. Nicot and C. Nguyen-The, eds. Plenum Press, New York, USA.
- Nicot, P.C., Decognet, V., Bardin, M., Romiti, C., Trottin, Y., Fournier, C., and Leyre, J.M. 2003. Potential for including *Microdochium dimerum*, a biocontrol agent against

Références bibliographiques

- Botrytis cinerea*, into an integrated protection scheme of greenhouse tomatoes, p. 19-23, in: Colloque international tomate sous abri, protection intégrée- agriculture biologique. CTIFL, Avignon, France.
- Nicot, P.C., Decognet, V., Fruit, L., Bardin, M., and Trottin, Y. 2002. Combined effect of microclimate and dose of application on the efficacy of biocontrol agents for the protection of pruning wounds on tomatoes against *Botrytis cinerea*. Bulletin OILB/SROP 25: 73-76.
- Nicot, P.C., Mermier, M., Vaissière, B.E., and Lagier, J. 1996. Differential spore production by *Botrytis cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light-absorbing polyethylene film. Plant Disease 80: 555-558.
- Nicot, P.C., Morison, N., and Mermier, M. 2001. Optical filters against grey mould of greenhouse crops, p. 134-145, in: Physical control methods in plant protection. C. Vincent, B. Panneton and F. Fleurat-Lessard, eds. Springer Verlag, Paris.
- Nigro, F., Schena, L., Ligorio, A., Pentimone, I., Ippolito, A., and Salerno, M.G. 2006. Control of table grape storage rots by pre-harvest applications of salts. Postharvest Biology and Technology 42: 142-149.
- Nordlund, D.A. 1996. Biological control, integrated pest management and conceptual models. Biocontrol News and Information 17: 35-44.
- O'Neill, T.M., Elad, Y., Shtienberg, D., and Cohen, A. 1996. Control of grapevine grey mould with *Trichoderma harzianum* T39. Biocontrol Science and Technology 6: 139-146.
- O'Neill, T.M., Shtienberg, D., and Elad, Y. 1997. Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. Plant Disease 81: 36-40.
- Okada, A., Banno, S., Ichiishi, A., Kimura, M., Yamaguchi, I., and Fujimura, M. 2005. Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa*. Journal of Pesticide Science 30: 378-383.
- Oyarzun, M.P., Quiroz, A., and Birkett, M.A. 2008. Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. Medical and Veterinary Entomology 22: 188-202.
- Ozcan, M. 1999. Antifungal properties of propolis. Grasas y Aceites 50: 395-398.
- Pappas, A.C., Cooke, B.K., and Jordan, V.W.L. 1979. Insensitivity of *Botrytis cinerea* to iprodione, procymidone and vinclozolin and their uptake by the fungus. Plant Pathology 28: 71-76.
- Paul, B. 1999. *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. FEMS Microbiology Letters 181: 277-280.
- Paul, B., Girard, I., Bhatnagar, T., and Bouchet, P. 1997. Suppression of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grape vine (*Vitis vinifera*) and its pectinolytic activities by a soil bacterium. Microbiological Research 152: 413-420
- Paulitz, T.C., and Belanger, R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology 39: 103-133.
- Paulitz, T.C., and Matta, A. 2000. The role of the host in biological control of diseases, p. 394-410, in: Integrated pest and disease management in greenhouse crops. R. Albajes, M. L. Gullino, J. C. Van Lenteren and Y. Elad, eds. Kluwer Academic Publisher, Wageningen, The Netherlands.
- Penalver, R., Vicedo, B., Salcedo, C.I., and Lopez, M.M. 1994. *Agrobacterium radiobacter* strains K84, K1026 and K84 Agr- produce an antibiotic-like substance, active *in vitro* against *Agrobacterium tumefaciens* and phytopathogenic *Erwinia* and *Pseudomonas* spp. Biocontrol Science and Technology 4: 259-267.
- Pezet, R., and Pont, V. 1995. Mode of toxic action of *Vitaceae stilbenes* on fungal cells, p. 317-331, in: Handbook of phytoalexin metabolism and action. M. Daniel and R. P. Purkayastha, eds. Marcel Dekker Inc, New York, USA.

Références bibliographiques

- Pezet, R., Pont, V., and Hoang-Van, K. 1991. Evidence for oxidative detoxification of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 441-450.
- Pitchay, D.S., Frantz, J.M., Locke, J.C., Krause, C.R., and Fernandez, G.C.J. 2007. Impact of applied nitrogen concentration on growth of elatior begonia and new guinea impatiens and susceptibility of begonia to *Botrytis cinerea*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132: 193-201.
- Powell, A.L.T., van Kan, J., ten Have, A., Visser, J., Greve, L.C., Bennett, A.B., and Labavitch, J.M. 2000. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 942-950.
- Quidde, T., Osbourn, A.E., and Tudzynski, P. 1998. Detoxification of alpha-tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 151-165.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., and de Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 537-547.
- Raposo, R., Delcan, J., Gomez, V., and Melgarejo, P. 1995. Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. *Plant Pathology* 45: 497-505.
- Raposo, R., Gomez, V., Urrutia, T., and Melgarejo, P. 2000. Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathology* 90: 1246-1249.
- Richard, C., and Boivin, G. 1994. Maladies et ravageurs des cultures légumières au Canada. *Société canadienne de phytopathologie et Société d'entomologie, Canada*, p. 590.
- Roberts, R.G. 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 80: 526-530.
- Rotem, J., and Aust, H.J. 1991. The effect of ultraviolet and solar radiation and temperature on survival of fungal propagules. *Journal of Phytopathology* 133: 76-84.
- Salinas, J., Glandorf, D.C.M., Picavet, F.D., and Verhoeff, K. 1989. Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 95: 51-64.
- Sandrock, R.W., and VanEtten, H.D. 1998. Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin alpha-tomatine. *Phytopathology* 88: 137-143.
- Sauphanor, B., Berling, M., Toubon, J.F., Reyes, M., Delantte, J., and Allemoz, P. 2006. Carpcapse des pommes: cas de résistance au virus de la granulose en vergers biologiques. *Phytoma-La Défense des Végétaux* 590: 24-27.
- Sbaghi, M., Jeandet, P., Bessis, R., and Leroux, P. 1996. Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathology* 45: 139-144.
- Schilder, A.M.C., Gillett, J.M., Sysak, R.W., and Wise, J.C. 2002. Evaluation of environmentally friendly products for control of fungal diseases of grapes, pp. 163–167. 10th International conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing and viticulture, Weinsberg, Germany, 2002/02/4-7.
- Schmitt, A., Kunz, S., Nandi, S., Seddon, B., and Ernst, A. 2002. Use of *Reynoutria sachalinensis* plant extracts, clay preparations and *Brevibacillus brevis* against fungal diseases of grape berries, pp. 146-151. 10th International conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing and viticulture, Weinsberg, Germany, 2002/02/4-7.
- Schoonbeek, H., del Sorbo, G., and De Waard, M.A. 2001. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 562-571.

Références bibliographiques

- Schoonbeek, H., Raaijmakers, J.M., and De Waard, M.A. 2002. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 1165-1172.
- Schoonbeek, H.J., Jacquat-Bovet, A.C., Mascher, F., and Metraux, J.P. 2007. Oxalate-degrading bacteria can protect *Arabidopsis thaliana* and crop plants against *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1535-1544.
- Schoustra, S.E., Debets, A.J.M., Slakhorst, M., and Hoekstra, R.F. 2006. Reducing the cost of resistance: experimental evolution in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 1115-1127.
- Schoustra, S.E., Slakhorst, M., Debets, A.J.M., and Hoekstra, R.F. 2005. Comparing artificial and natural selection in rate of adaptation to genetic stress in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 771-778.
- Schouten, A., Maksimova, O., Cuesta-Arenas, Y., van den Berg, G., and Raaijmakers, J.M. 2008. Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology* 10: 1145-1157.
- Schouten, A., van den Berg, G., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Alabouvette, C., de Vos, C.H., Lemanceau, P., and Raaijmakers, J.M. 2004. Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1201-1211.
- Schouten, A., Wagemakers, L., Stefanato, F.L., Kaaij, R.M.v.d., and Kan, J.A.L.v. 2002. Resveratrol acts as a natural profungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Molecular Microbiology* 43: 883-894.
- Sean, T., Opera, M., Podosu Cristescu, A., Tica, C., and Oancea, F. 1999. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine with *Trichoderma* spp. and *Saccharomyces chevalieri*. *Bulletin of the Polish Academy of Biological Sciences* 47: 197-205.
- Sequeira, L. 1983. Mechanisms of induced resistance in plants. *Annual Review of Microbiology* 37: 51-79.
- Sergeeva, V., Nair, N.G., Verdane, J.R., Shen, C., Barchia, I., and Spooner-Hart, R. 2002. First report of anilinopyrimidine-resistant phenotypes in *Botrytis cinerea* on grapevines in Australia. *Australasian Plant Pathology* 31: 299-300.
- Shadomy, S. 1971. *In Vitro* antifungal activity of clotrimazole. *Infection and Immunity* 4: 143-148.
- Shiraishi, M., Fukutomi, M., and Akai, S. 1970a. Effects of temperature on the conidium germination and appressorium formation of *Botrytis cinerea* Pers. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 36: 234-236.
- Shiraishi, M., Fukutomi, M., and Akai, S. 1970b. Recovery of germinability of aged conidia of *Botrytis cinerea* Pers. by several saccharides. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 36: 297-303.
- Shtienberg, D., and Elad, Y. 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 87: 332-340.
- Simay, E.I. 1988. *In vivo* occurrence of hyperparasitism of *Botrytis cinerea* Pers. by *Gliocladium catenulatum* Gilman Abbott. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 23: 133-135.
- Sirry, A.E.R. 1957. The effect of relative humidity on the germination of *Botrytis* spores and on the severity of *Botrytis cinerea* pers on lettuce. *Annals of Agricultural Science (Cairo)* 2: 247-250.
- Smith, R.E. 1900. *Botrytis* and *Sclerotinia*; their relation to certain plant diseases and to each other. *Botanical Gazette* 29: 369-407.

Références bibliographiques

- Snow, D. 1949. The germination of mould spores at controlled humidities. *Annals of Applied Biology* 36: 1-13.
- Stergiopoulos, I., Zwiers, L.-H., and De Waard, M.A. 2002. Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. *European Journal of Plant Pathology* 108: 719-734.
- Steward, T.M., and Long, P.G. 1987. Sporulation of *Botrytis cinerea* in the dark. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 15: 389-392.
- Stockwell, V.O., Kawalek, M.D., L.W., M., and J.E., L. 1996. Transfer of pAgK84 from the biocontrol agent *Agrobacterium radiobacter* K84 to under field conditions. *Phytopathology* 86: 31-37.
- Sutton, J.C., and Peng, G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83: 615-623.
- Suty, A., Pontzen, R., and Stenzel, K. 1999. Fenhexamid- sensitivity of *Botrytis cinerea*: determination of baseline sensitivity and assessment of the resistance risk. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 52: 145-157.
- Suzuki, Y., Kumagai, T., and Oda, Y. 1977. Locus of blue and near ultraviolet reversible photoreaction in the stages of conidial development in *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* 98: 199-204.
- Swadling, I.R., and Jeffries, P. 1998. Antagonistic properties of two bacterial biocontrol agents of grey mould disease. *Biocontrol Science and Technology* 8: 439-448
- Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 39: 47-79.
- Taczman-Bruckner, A., Mohacsi-Farkas, C., Balla, C., and Kisko, G. 2005. Mode of action of *Kluyveromyces lactis* in biocontrol of *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria* 34: 153-160.
- Terrentroy, A. 1994. Tomate serre: enquête sur le *Botrytis* dans les cultures de tomate précoce. APREL Bulletin N°S-641 Chamber of Agriculture of Bouches du Rhône, France.
- Thomas, C.S., and Marois, J.J. 1986. Effect of wind and relative humidity on sporulation and external mycelium formation of *Botrytis* on grape. *Phytopathology* 76: 1114.
- Thomashow, L.S. 1996. Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 343-347.
- Thompson, J.R., and Latorre, B.A. 1999. Characterization of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile using RAPD-PCR. *Plant Disease* 83: 1090-1094.
- Tiedemann, A. 1997. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 151-166.
- Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., and Bruni, A. 1996. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytotherapy Research* 10: 335-336.
- Tripathi, P., and Dubey, N.K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 32: 235-245.
- Tronsmo, A., and Dennis, C. 1977. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 83: 449-455.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagianti, S., and Aziz, A. 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany* 64: 21-32.

Références bibliographiques

- Uchneat, M.S., Spicer, K., and Craig, R. 1999. Differential response to floral infection by *Botrytis cinerea* within the genus *Pelargonium*. HortScience 34: 718-720.
- Upadhyay, A., and Srivastava, S. 2008. Characterization of a new isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd as a potential biocontrol agent. Letters in Applied Microbiology 47: 98-105.
- Urbasch, I. 1983. Über entstehung und keimung der chlamydosporen von *Botrytis cinerea* Pers. Phytopathologische Zeitschrift 108: 54-60.
- Urbasch, I. 1984. Kugelige, umhüllte Mikrokonidien-Aggregate als Überdauerungs- und Verbreitungseinheiten von *Botrytis cinerea* Pers. Phytopathologische Zeitschrift 109: 241-244.
- Urbasch, I. 1985a. Dedifferenzierung der appressorien von *Botrytis cinerea* Pers. unter bildung von mikrokonidien – relation zur resistenz von *Lycopersicon* spp. gegen *B. cinerea*. Phytopathologische Zeitschrift 113: 348-358.
- Urbasch, I. 1985b. Ultrastructural studies on the microconidia of *Botrytis cinerea* Pers. and their phialoconidial development. Journal of Phytopathology 112: 229-237.
- Van den Ende, J.E., and Pennock, I. 1996. The perfect stage of *Botrytis elliptica*, pp. 16. XIth International *Botrytis* Symposium, Wageningen, The Netherlands.
- Van Lenteren, J.C. 2000. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? Crop Protection 19: 375-384.
- Vancon, S. 1992. Fertilisation, croissance et sensibilité au *Botrytis cinerea* du *Sequoiadendron giganteum*. P.H.M. Revue Horticole 327: 13-20.
- Verhoeff, K. 1968. Studies on *Botrytis cinerea* in tomatoes. Effect of soil nitrogen level and of methods of deleafing upon the occurrence of *Borytis cinerea* under commercial conditions. European Journal of Plant Pathology 74: 184-192.
- Verhoeff, K., and Liem, J.I. 1975. Toxicity of tomatine to *Botrytis cinerea*, in relation to latency. Journal of Phytopathology 82: 333-338.
- Vermeulen, T., Schoonbeek, H., and Maarten, A.D.W. 2001. The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. Pest Management Science 57: 393-402.
- Viaud, M., Fillinger, S., Liu, W., Polepalli, J.S., Le Pecheur, P., Kunduru, A.R., Leroux, P., and Legendre, L. 2006. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. Molecular Plant-Microbe Interactions 19: 1042-1050.
- Vicedo, B., Penalver, R., Asins, M.J., and Lopez, M.M. 1993. Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pAgK84 transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tra-mutant strain K1026. Applied and Environmental Microbiology 59: 309-315.
- Viennot-Bourgin. 1965. Encyclopédie mycologique XXVII. Lechevalier, Paris 350 p.
- Vignutelli, A., Hilber-Bodmer, M., and Hilber, U.W. 2002. Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*. Mycological Research 106: 329-335.
- Volpin, H., and Elad, Y. 1991. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to *Botrytis* blight. Phytopathology 81: 1390-1394.
- Walker, P., and Crane, E. 1987. Constituents of propolis. Apidologie 18: 327-334.
- West, J.S., Pearson, S., Hadley, P., Wheldon, A.E., Davis, F.J., Gilbert, A., and Henbest, R.G.C. 2000. Spectral filters for the control of *Botrytis cinerea*. Annals of Applied Biology 136: 115-120.
- Wheatley, R.E. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 81: 357-364.

Références bibliographiques

- Whetzel, H.H. 1945. A synopsis of the genera and species of the *Sclerotiniaceae*, a family of stromatic inoperculate discomycetes. *Mycologia* 37: 648-714.
- Whipps, J.M., and Gerlagh, M. 1992. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological Research* 96: 897-907.
- Williamson, B., Duncan, G.H., Harrison, J.G., Harding, L.A., Elad, Y., and Zimand, G. 1995. Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 99: 1303-1310.
- Wood, R.K.S. 1951. The control of diseases of lettuce by use of antagonistic microorganisms I. The control of *Botrytis cinerea* Pers. *Annals of Applied Biology* 38: 203-216.
- Xiao, C.L., Chandler, C.K., Price, J.F., Duval, J.R., Mertely, J.C., and Legard, D.E. 2001. Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. *Plant Disease* 85: 901-909.
- Yang, X.J., Yang, L.J., Zeng, F.S., Xiang, L.B., Wang, S.N., Yu, D.Z., and Ni, H. 2008. Distribution of baseline sensitivities to natural product phytoalexin among isolates of *Sphaerotheca fuliginea* and *Pseudoperonospora cubensis*. *Plant Disease* 92: 1451-1455.
- Yoder, O.C., and Turgeon, B.G. 2001. Fungal genomics and pathology. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 315-321.
- Yoder, O.C., and Whalen, M.L. 1975. Factors affecting postharvest infection of stored cabbage tissue by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany* 53: 691-699.
- Yourman, L.F., Jeffers, S.N., and Dean, R.A. 2000. Genetic analysis of isolates of *Botrytis cinerea* sensitive and resistant to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* 90: 851-859.
- Yourman, L.F., Jeffers, S.N., and Dean, R.A. 2003. Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 311-317.
- Yu, H., and Sutton, J.C. 1997. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19: 237-246.
- Yunis, H., Elad, Y., and Mahrer, Y. 1990. Effects of air temperature, relative humidity and canopy wetness on gray mold of cucumbers in unheated greenhouses. *Phytoparasitica* 18: 203-215.
- Zhang, C.Q., Zhu, J.W., Wei, F.L., Liu, S.Y., and Zhu, G.N. 2007. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables to DMIs and fenhexamid. *Phytoparasitica* 35: 300-313.
- Zimand, G., Elad, Y., and Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86: 1255-1260.
- Ziogas, B.N., Markoglou, A.N., and Malandrakis, A.A. 2003. Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 311-317.
- Ziogas, B.N., Markoglou, A.N., and Spyropoulou, V. 2005. Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *European Journal of Plant Pathology* 113: 83-100.

Abstract

Gray mould, caused by *Botrytis cinerea*, is a severe disease on a wide range of crops. Disease control generally relies on chemicals, although biological control strategies have been intensively studied over the last decades. This pathogen can withstand a wide variety of fungitoxic compounds including fungicides and natural molecules. This capacity to adapt to different stress might, potentially, compromise the durability of biological control methods. The global purpose of that work was to estimate the potential of *B. cinerea* to overcome the efficacy of biological control agents. Knowledge on the potential development of resistance to biological control agents can help to devise or improve resistance management strategies. In this work, efforts have been focused on the antibiotic pyrrolnitrin produced by various bacteria described as potential biological control agents against *B. cinerea*. The specific objectives of the study were (i) to evaluate the diversity in susceptibility to pyrrolnitrin among natural population of *B. cinerea*, (ii) to estimate the risk of loss of efficacy of pyrrolnitrin-producing biological control agent due to selection pressure exerted by pyrrolnitrin and (iii) to study the mechanism of resistance to pyrrolnitrin in *B. cinerea*.

An important range of sensitivity to pyrrolnitrin with an 8.4-fold difference in EC₅₀ values between the most sensitive and the least sensitive isolates was observed within the 204 isolates tested. The production of 20 generations, for 4 isolates of *B. cinerea*, on increasing doses of pyrrolnitrin, resulted in the development of mutants of *B. cinerea* with high levels of resistance to the antibiotic and a reduced sensitivity *in vitro* to the pyrrolnitrin-producing *Pseudomonas chlororaphis* PhZ24. Comparison of the pyrrolnitrin-resistant mutants and their sensitive parent isolates for mycelial growth, sporulation and aggressiveness on plant tissues revealed that the high level of resistance to pyrrolnitrin has resulted in a high fitness cost. Additional cytohistological investigations revealed that while the sensitive isolate spread throughout the petiole and rapidly invaded the stem *via* the abscission zone, the pyrrolnitrin-resistant mutant failed to extend beyond petiole to invade the stem. Moreover, the pyrrolnitrin-resistant mutant formed abnormal mycelium and chlamydospore-like cells. The comparison of resistance to pyrrolnitrin and to the iprodione fungicide in *B. cinerea* revealed that fungicide pressure exerted on the fungus is able to build-up resistance to pyrrolnitrin. Comparison of sequences of the osmosensing class III histidine kinase encoding gene *bos1* revealed different mutations in pyrrolnitrin- and iprodione-resistant mutants. However, resistance to pyrrolnitrin and to iprodione was not systematically associated with a point mutation in the *Bos1* gene. Finally, no changes were observed in the allele size at nine microsatellite loci whatever the four selective pressure endured by the fungus despite their phenotypic changes. This study provides evidence that a fungal plant pathogen is able to gradually build-up resistance to an antibiotic produced by a biocontrol agent.

Keywords: *Botrytis cinerea*, biological control, durability, pyrrolnitrin, *Pseudomonas chlororaphis* PhZ24, diversity, fungicides, fitness, histidine kinase, mutation, cytohistology, experimental evolution, microsatellite

Résumé

La pourriture grise, causée par le champignon *Botrytis cinerea*, est l'une des principales maladies aériennes fongiques sur diverses cultures d'importance agronomique. La diversité génétique de *B. cinerea* est très forte et la capacité rapide d'adaptation de ce champignon à une pression sélective est également avérée. Ce champignon est ainsi capable de développer des résistances à une grande variété de composés fongicides de synthèse ou d'origine naturelle. Des méthodes alternatives de lutte ont de ce fait été développées ces dernières années : divers agents de lutte biologique (ALB) présentant différents modes d'actions ont été identifiés et pour certains d'entre eux commercialisés pour contrôler *B. cinerea*. Cependant la durabilité de la lutte biologique est un domaine encore très peu étudié. La perte d'efficacité d'un ALB pourrait résulter de la préexistence d'isolats moins sensibles de pathogènes dans les populations naturelles et/ou de la capacité de l'agent pathogène à produire, sous une pression de sélection continue exercée par l'ALB, des mutants ayant une sensibilité réduite. L'objectif global de la présente étude est d'évaluer le risque potentiel de perte d'efficacité de la lutte biologique vis-à-vis de *B. cinerea*. Dans cette étude, les efforts ont été concentrés sur la pyrrolnitrine, un antibiotique produit par divers ALBs, dont certains sont efficaces contre *B. cinerea*. Les objectifs spécifiques de l'étude étaient (i) d'évaluer la diversité de la sensibilité à la pyrrolnitrine au sein de la population naturelle de *B. cinerea*, (ii) d'estimer le risque de perte d'efficacité des ALBs produisant la pyrrolnitrine due à la pression de sélection exercée par la pyrrolnitrine et (iii) d'étudier le mécanisme de résistance à la pyrrolnitrine chez *B. cinerea*.

Parmi 204 isolats de *B. cinerea*, une gamme importante de sensibilité à la pyrrolnitrine a été observée, avec un facteur de résistance de 8,4 entre l'isolat le plus sensible et l'isolat le moins sensible. La production de 20 générations successives pour 4 isolats de *B. cinerea*, sur des doses croissantes de pyrrolnitrine, a abouti au développement de mutants avec des niveaux élevés de résistance à l'antibiotique, et à une réduction *in vitro* de la sensibilité à la bactérie productrice de pyrrolnitrine *Pseudomonas chlororaphis* PhZ24. La comparaison entre les mutants résistants à la pyrrolnitrine et leurs parents sensibles pour la croissance mycélienne, la sporulation et l'agressivité sur plantes a révélé que la résistance à la pyrrolnitrine est associée à un fort coût adaptatif. Des observations cytohistologiques sur tomates ont confirmé que l'isolat sensible à la pyrrolnitrine attaque le pétiole rapidement et envahit la tige, alors que le mutant résistant à la pyrrolnitrine ne s'étend pas au-delà du pétiole. De plus, ce dernier mutant forme un mycélium anormal et des cellules ressemblant à des chlamydo-spores. Les résultats ont d'autre part révélé que les mutants de *B. cinerea* résistants à la pyrrolnitrine sont résistants au fongicide iprodione, suggérant ainsi qu'une pression exercée par la pyrrolnitrine sur le champignon conduit à une résistance au fongicide. Réciproquement, la production de générations successives sur iprodione conduit à une résistance à l'antibiotique. Afin d'étudier les déterminants moléculaires de la résistance de *B. cinerea* à la pyrrolnitrine, le gène histidine kinase *Bos1*, impliqué entre autres dans la résistance aux fongicides chez *B. cinerea* a été séquencé chez les souches sensibles et les mutants résistants. La comparaison des séquences a mis en évidence des mutations ponctuelles différentes chez les mutants de *B. cinerea* obtenus sur la pyrrolnitrine et ceux obtenus sur l'iprodione. De plus, les résistances à la pyrrolnitrine et à l'iprodione ne sont pas systématiquement associées à une mutation ponctuelle dans le gène *Bos1*. Enfin, aucune modification n'a été détectée dans la taille des allèles de neuf locus microsatellites quelle que soit la pression sélective exercée et quelle que soit le phénotype du mutant produit. Cette étude montre qu'un champignon pathogène des plantes est capable de développer progressivement une moindre sensibilité à un agent de lutte biologique mais que cette moindre sensibilité est associée à une forte perte de fitness.

Mots-clés: *Botrytis cinerea*, lutte biologique, durabilité, pyrrolnitrine, *Pseudomonas chlororaphis* PhZ24, diversité, fongicides, fitness, histidine kinase, mutation, cytohistologie, évolution expérimentale, microsatellite