



**INNOVATIONS DANS LES MÉTHODOLOGIES DE DÉTECTION DES MALADIES DE LA VIGNE :
DÉTECTION SIMULTANÉE, IDENTIFICATION DE LA RÉSISTANCE AUX FONGICIDES ET OUTIL
D'AIDE AU PRÉDIAGNOSTIC AU CHAMP.**

19-004-2.2-C-CRAM

DURÉE DU PROJET : AVRIL 2019 / FÉVRIER 2024

RAPPORT FINAL

Réalisé par :

Caroline Provost, chercheur CRAM

Pierre-Olivier Hébert, professionnel AAC

Audrey-Anne Durand, postdoctorante, INRS-AFSB

Odile Carisse, chercheur AAC

Philippe Constant, professeur INRS- AFSB

Collaboration:

Hervé Van der Heyden, chercheur AAC (séquençage Nanopore et bio-informatique)



Institut national
de la recherche
scientifique



CRAM
CENTRE DE RECHERCHE
AGROALIMENTAIRE DE MIRABEL



Agriculture and
Agri-Food Canada

Agriculture et
Agroalimentaire Canada

Février 2024

Les résultats, opinions et recommandations exprimés dans ce rapport émanent de l'auteur ou des auteurs et n'engagent aucunement le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

**INNOVATIONS DANS LES MÉTHODOLOGIES DE DÉTECTION DES MALADIES DE LA VIGNE:
DÉTECTION SIMULTANÉE, IDENTIFICATION DE LA RÉSISTANCE AUX FONGICIDES ET OUTIL
D'AIDE AU PRÉDIAGNOSTIC AU CHAMP.**

19-004-2.2-C-CRAM

RÉSUMÉ DU PROJET

Les maladies susceptibles de causer des dommages à la vigne sont causées par un large éventail d'organismes: phytoplasmes, virus, bactéries, levures, pseudochampignons et champignons. Ces organismes affectent les différents organes de la vigne, soit les racines, bois, sarments, feuilles et baies. Les symptômes visuels varient selon les conditions météorologiques, l'état de santé de la vigne (stress, carence), l'âge des organes affectés et la population de l'agent pathogène (taille et diversité génétique). Le diagnostic de ces organismes et des maladies qu'ils causent est donc complexe d'autant que certains de ces organismes peuvent être dans un stade 'latent' sans causer de symptômes apparents ou être plusieurs à affecter simultanément la vigne. De plus, certains des champignons pathogènes se sont adaptés aux fongicides, adaptation généralement exprimée par des mutations dans leur génome. Les individus résistants présentent des phénotypes semblables, ce qui rend le diagnostic visuel impossible. Par contre, il est possible de détecter les individus résistants à l'aide de tests moléculaires. C'est dans ce contexte que le projet a été réalisé et visait à développer des tests moléculaires qui permettent de détecter et d'identifier ces organismes ainsi que les mutations liées à la résistance aux fongicides. Les champignons ciblés sont les nouvelles espèces de *Botrytis cinerea* (pourriture de la grappe/moisissure grise), *Elsinoë ampelina* (anthracnose), *Erysiphe necator* (blanc), *Guignardia bidwellii* (pourriture noire), *Phomopsis viticola* (excoriose), les nouvelles sous-espèces de *Plasmopara viticola* *riparia*, *P.v. aestivalis* et *P.v. vinifera* (mildiou), *Colletotrichum* spp. (pourriture de maturité des baies), *Greeneria uvicola* (pourriture amère), *Pilidiella diploidiella* (rot blanc) et *Pseudopezicula tracheiphila* (rougeot parasitaire). Les deux premières années du projet ont permis d'évaluer la performance de deux kits d'extraction d'ADN commerciaux fréquemment utilisés par le laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection, et de développer des méthodes qPCR pour l'identification de la plupart des organismes ciblés. Pour la détection des mutations responsables de la résistance aux fongicides chez le champignon pathogène *B. cinerea* la mise au point d'un protocole de séquençage par nanopore a été complété et les validations ont été réalisées. Dans le cadre de ce projet, 15 protocoles de détection simplex pour les divers champignons et 4 protocoles multiplex ont été développés et validés. Un protocole pour détecter la présence de plusieurs champignons pathogènes dans la vigne ainsi qu'un protocole pour détecter la présence de résistance de *Botrytis cinerea* à diverses matières actives de fongicides ont aussi été développés. Tous les protocoles ont été transférés au LEDP.

OBJECTIFS ET APERÇU DE LA MÉTHODOLOGIE

L'objectif principal du projet était de développer et d'adapter des tests de diagnostic moléculaire pour les champignons pathogènes de la vigne et la résistance aux fongicides qui soient rapides, fiables et peu coûteux. Les objectifs secondaires étaient:

1. Répertorier et identifier les amorces (séquences) nécessaires à l'identification des champignons et des résistances aux fongicides;
2. Mettre au point des méthodes d'extraction d'ADN à partir de différents types d'échantillons (bois, feuilles, baies);
3. Mettre au point des tests de détection simultanée de plusieurs champignons pathogènes de la vigne et des mutations liées à la résistance aux fongicides en utilisant les méthodes de séquençage par nanopores;
4. Développer des outils d'aide au diagnostic au champ (séquençage par nanopores).

Les différentes étapes réalisées dans le cadre du projet sont:

Étape 1. Méthode d'extraction d'ADN à partir d'échantillons de bois aouté, bois vert, feuilles et baies.

- 1.1. Une revue de littérature sur les différentes méthodes d'extraction d'ADN de champignon à partir de différents types d'échantillons incluant la liste des inhibiteurs potentiels a été complétée.
- 1.2. Une méthode a été mise au point pour l'inoculation des tiges, baies et feuilles avec *B. cinerea*, *P. viticola* et *E. ampelina*.
- 1.3. Des méthodes d'extraction ont été évaluées avec 2 trousseaux commerciales (Tab. II).
- 1.4. Les protocoles d'extraction d'ADN selon les inhibiteurs présents ont été mis au point ainsi que la détermination de l'efficacité d'extraction.
- 1.5. Les résultats ont été transmis au laboratoire de diagnostic en avril 2021.

Étape 2. Développement de nouveaux tests de diagnostic (qPCR).

- 2.1. Une liste des agents pathogènes ciblés pour des tests en simplex et en multiplex a été identifiée puis validée avec le LEDP (Tab. I).
- 2.2. Les tests en qPCR pour *Plasmopara viticola* *P.v. aestivalis* et *P.v. riparia*, *Erysiphe necator*, et *Botrytis cinerea* développés selon la méthode décrite par l'équipe du Dr Carisse (2014, 2021) ont été adaptés pour les différents types d'échantillons.
- 2.3. Des cultures types des champignons suivants ont été achetées de banques reconnues (ex. ATCC): *Guignardia bidwellii*, *Phomopsis viticola*, *Colletotrichum* spp., *Greeneria uvicola*, *Pilidiella diplodiella* et *Pseudopezicula tracheiphila*.
- 2.4. Pour la première série de tests, en utilisant la méthode d'extraction d'ADN obtenue suite à l'objectif 1, une banque d'ADN a été recueillie et une portion des régions ITS1, ITS2, calmoduline, histone, H3 (HIS3), facteur d'élongation 1- α (TEF) ou autres gènes selon le champignon ciblé, a été séquencée. De plus, les séquences disponibles sur NCBI pour ces

mêmes gènes ont également été récupérées et l'ensemble des séquences ont été alignées avec les séquences homologues provenant d'autres champignons pathogènes.

- 2.5. À l'aide de ces alignements de séquences, les systèmes amorces/sondes spécifiques aux champignons ciblés ont été développés, puis testés au laboratoire. Différentes approches ont été utilisées afin de valider la spécificité des systèmes développés (ex : bibliothèques d'amplicons, isolats provenant de champignons pathogènes similaires, etc.)
- 2.6. Ces systèmes d'amorces et sondes doivent répondre aux critères de sensibilité et spécificité permettant la détection d'une quantité connue d'ADN dans un échantillon. Le système doit demeurer stable en présence du contrôle interne, et permettre le développement d'une courbe standard linéaire pour la quantification.
- 2.7. Pour chaque test simple ou multiplexé, un protocole détaillé a été rédigé.

Étape 3. Validation des tests.

En plus de la validation faite à partir d'inoculations artificielles, un appel a été fait auprès des conseillers viticoles afin d'obtenir des échantillons infectés par les champignons ciblés. Le diagnostic sur ces échantillons a été fait par le LEDP selon les méthodes non moléculaires et comparé aux tests développés dans le cadre de ce projet (nombre de faux positifs et de faux négatifs). Au besoin, les tests moléculaires ont été modifiés afin d'optimiser le diagnostic. Une collaboration avec le LEDP a été maintenue pour avoir des échantillons provenant du terrain. Toutefois, pour trois champignons, soit *P. tracheiphila*, *P. diplodiella* et *Colletotrichum gloeosporioides*, aucun cas n'a été détecté au LEDP et aucun n'échantillon n'a été retrouvé sur le terrain, et ce malgré plusieurs appels aux agronomes du Québec, mais aussi en Ontario. Ainsi, pour ces trois champignons, les protocoles développés n'ont pas pu être validés sur des échantillons terrain.

Étape 4. Développement de nouveaux tests de détection de champignon pathogène et mutations liées à la résistance aux fongicides selon la méthode de séquençage par Nanopore.

Dans un premier temps, une base de données de séquences de référence, comprenant, pour le moment, les régions ITS1-5.8s-ITS2 (champignons et oomycètes) ainsi qu'une collection de séquences comprenant les gènes liés à la résistance aux fongicides a été faite. Les banques de séquences continuent d'être bonifiées.

La préparation des bibliothèques a été faite avec le kit Native Barcoding Kit 96 V14 (SQK-NBD114.96) d'Oxford Nanopore Technologies (ONT). Le séquençage a été fait avec des cellules R10.4.1 et séquençé à l'aide d'un séquenceur MK1C.

L'ADN provenant des extractions d'isolats en culture ou prélevé sur des parties de plantes symptomatiques a été utilisé, chacun ayant été étiqueté avec un code-barres unique, pour les essais préliminaires de diagnostic par Nanopore. Le résumé du protocole est présenté à la figure 1. Afin de valider les résultats de séquençage obtenu avec la méthode par Nanopore, les mêmes

échantillons (solutions d'acides nucléiques) ont été envoyés pour séquençage à Génome Québec.

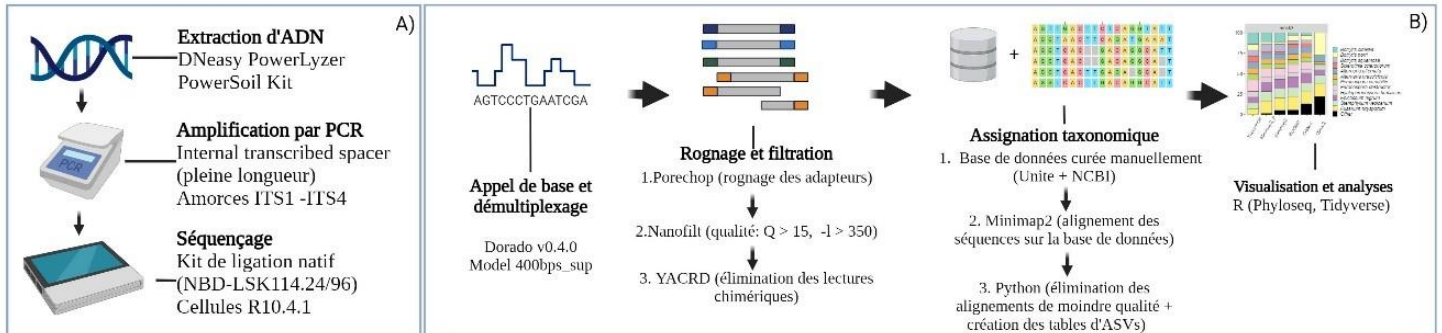


Figure 1 : Résumé du protocole de séquençage d'amplicons par Nanopore sur Mk1C.

Étape 5 Adapter les tests de diagnostics moléculaires pour le prédiagnostic au champ ou dans des laboratoires de proximité.

Puisque les tests de diagnostic basés sur les méthodes de LAMP-PCR sont portables, une validation de ces méthodes pour le prédiagnostic directement au champ a été faite par l'équipe. Des échantillons présentant différents types de symptômes ont été diagnostiqués au champ puis au laboratoire à l'aide de la PCR conventionnelle et du séquençage au besoin afin de comparer les tests d'analyse d'ADN au laboratoire versus au champ.

Tableau I : Détail des systèmes simplex et multiplex développés dans le cadre du projet.

Système	Organismes ciblés	Nom commun	Organes	Responsable	État avancement
Simplex	<i>Elsinoë ampelina</i>	Anthraxnose	Feuilles, baies, sarments	CRDH	Protocole envoyé au LEDP
Simplex	<i>Erysiphe necator</i>	Blanc	Feuilles, baies, sarments	CRDH	Protocole disponible au LEDP
Simplex	<i>Guignardia bidwellii</i>	Pourriture noire	Baies	CRDH	Protocole disponible au LEDP.
Simplex	<i>Phomopsis viticola</i>	Excoriose	Bois vert	INRS	Système développé par Ozaki (2017). Pas assez de dissimilarité entre les espèces pour modifier l'essai.
Simplex	<i>Greeneria uvicola</i>	Pourriture amère	Baies	INRS	Les protocoles (SYBRGreen et TaqMan) sont disponibles au LEDP.
Simplex	<i>Pilidiella diploidiella</i>	Rot blanc	Baies	INRS	Protocole disponible au LEDP
Simplex	<i>Pseudopezicula tracheiphila</i>	Rougeot parasitaire	Feuilles	INRS	Protocole développé, mais non validé
Multiplex	<i>Plasmopara viticola riparia</i> , <i>P.v. aestivalis</i> , et <i>P.v. vinifera</i>	Mildiou	Feuilles et baies	CRDH	Protocole disponible au LEDP.
Multiplex	<i>Botrytis pseudocinerea</i> , <i>Botrytis cinerea stricto sensu</i>	Pourriture grise	Baies	CRDH	Protocole disponible au LEDP.
Multiplex	<i>Elsinoë ampelina</i> , <i>Guignardia bidwellii</i> ,	Anthraxnose et pourriture noire	Baies	CRDH	Protocole disponible au LEDP.
Multiplex	<i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , et <i>C. viniferum</i>	Pourriture maturité des baies	Baies	CRDH	Protocole disponible au LEDP.
Multiplex	<i>Elsinoë ampelina</i> , <i>Phomopsis viticola</i>	Anthraxnose et excoriose	Feuilles	CRDH	Protocole développé, validation en cours

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS

Étape 1. Méthode d'extraction d'ADN à partir d'échantillons de bois aouté, bois vert, feuilles et baies.

Une revue de littérature sur les différentes méthodes d'extraction d'ADN de champignon à partir de différents types d'échantillons incluant la liste des inhibiteurs potentiels a été complétée et envoyée (Annexe 8). À partir de cette revue, une méthode a été mise au point pour l'inoculation des tiges, baies et feuilles avec *B. cinerea*, *P. viticola* et *E. ampelina*. Les protocoles d'extraction d'ADN selon les inhibiteurs présents ont été mis au point ainsi que la détermination de l'efficacité d'extraction. Les résultats ont été transmis au laboratoire de diagnostic en avril 2021. Le protocole est présenté en Annexes 3 et 6.

Plus spécifiquement, deux kits commerciaux pour l'extraction d'ADN ont été évalués: DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) et PowerLyzer PowerSoil (Qiagen). Selon les résultats obtenus (Tab. II), il est recommandé :

- Utiliser le kit PowerLyzer PowerSoil pour l'extraction d'ADN
- Découper les lésions en petits morceaux d'environ 2mm x 2mm afin de faciliter l'extraction d'ADN
- Aucune modification requise au niveau du protocole

Tableau II : Propriétés des 2 kits commerciaux pour l'extraction de l'ADN sur diverses parties de la plante.

Extraction d'ADN



DNeasy Plant Mini Kit

Qualité et quantité

- Mycélium ✗
- Tige verte ✗
- Tige aoûtée ✗
- Feuilles ✗
- Portions de baie ✗
- Baie entière ✗

PowerLyzer PowerSoil

Qualité et quantité

- Mycélium ✗
- Tige verte ✗
- Tige aoûtée ✗
- Feuilles ✗
- Portions de baie ✗
- Baie entière ✗

Extraction d'ADN

DNeasy Plant Mini Kit

Amplification PCR

- Mycélium ✓
- Tige aoûtée ✗
- Tige verte ✓
- Feuilles ✓
- Portions de baie ✗
- Baie entière ✗

PowerLyzer PowerSoil

Amplification PCR

- Mycélium ✓
- Tige aoûtée ✓
- Bois vert ✓
- Feuilles ✓
- Portions de baie ✓
- Baie entière ✓

Pour la qualité et la quantité d'ADN extraite avec les 2 trousseaux, une croix rouge indique qu'il y avait peu d'ADN et/ou que l'ADN était de mauvaise qualité (ratios 260/280 et 260/230). Pour l'amplification PCR, une croix rouge indique qu'il n'y a pas eu d'amplification, alors qu'un crochet vert indique que l'amplification du gène ciblé a fonctionné.

Étape 2. Développement de nouveaux tests de diagnostic (qPCR).

Le développement des protocoles qPCR pour la liste des agents pathogènes ciblés pour des tests en simplex et en multiplex a été complété et tous les protocoles sont en Annexe 1 et 4 (*Collectotrichum* sp.) (Tab. I et III). Tous les protocoles ont été transférés au LEDP, à l'exception du qPCR en duplex pour *Elsinoë ampelina* et *Phomopsis viticola* et du qPCR pour la détection de *Pseudopezicula tracheiphila* en raison du manque de séquences et d'isolats disponible pour réaliser l'essai. Les protocoles pour *Plasmopara viticola* et pour *E. ampelina* ont été ajustés au LEDP. Le protocole pour *Pilidiella diplodiella* a été transmis au LEDP et il est disponible.

Tableau III : Synthèse des protocoles développés par qPCR.

Organismes ciblés	Région ciblée	Système	Amorces et sondes
<i>Elsinoë ampelina</i>	ITS	Simplex	Spécifique à <i>E. ampelina</i> (Sonde ultra spécifique, amorces « collent » sur quelques espèces d' <i>Elsinoë</i>)
<i>Erysiphe necator</i>	ITS	Simplex	Spécifiques à <i>E. necator</i>
<i>Guignardia bidwellii</i>	ITS	Simplex	Amorces spécifiques à <i>G. bidwellii</i> , sonde moins spécifique
<i>Phomopsis viticola</i>	ITS	Simplex	Amorces ITS universelles ainsi qu'une sonde TaqMan spécifique pour <i>Ph. viticola</i>
<i>Greeneria uvicola</i>	ITS	Simplex (2X)	Spécificité des amorces à <i>G. uvicola</i> confirmée par outils de bioinformatiques Sonde spécifique développée pour TaqMan
<i>Pilidiella diploidiella</i>	H3	Simplex	Amorces et sonde spécifiques développées pour le gène de références
<i>Pseudopezicula tracheiphila</i>	ITS	Simplex	Aucune amorce n'a pu être développée par manque de séquences ainsi que de souches.
<i>Plasmopara viticola riparia</i> , <i>P.v. aestivalis</i> , et <i>P.v. vinifera</i>	ITS	Simplex (3X) Triplex	Amorces et sondes spécifiques à <i>P. viticola</i> f.sp. <i>riparia</i> , <i>P. viticola</i> f. sp. <i>aestivalis</i> et <i>P. viticola</i> f.sp. <i>vinifera</i> (seulement la sonde pour ce dernier). Simplex et Triplex testés et fonctionnels.
<i>Botrytis pseudocinerea</i> , <i>B. cinerea sensu stricto</i>	IGS	Simplex (2X) Duplex	Simplex et Duplex testés et fonctionnels.
<i>Elsinoe ampelina</i> , <i>Guignardia bidwellii</i> ,	ITS	Duplex	Duplex testé et fonctionnel.
<i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , et <i>C. viniferum</i>	B-tubuline	Simplex (<i>C. acutatum</i>) Simplex (<i>C. gloeosporioides</i>) Simplex (<i>C. viniferum</i>) Triplex	Simplex et triplex testés et fonctionnels. Les systèmes pour <i>C. gloeosporioides</i> et <i>C. viniferum</i> ont seulement été testé sur gBlocks.
<i>Elsinoe ampelina</i> , <i>Phomopsis viticola</i>	ITS	Duplex	Simplex en cours

Étape 3. Validation des tests.

Durant les saisons 2021, 2022 et 2023, le LEDP a envoyé quelques échantillons à AAC et l'INRS-AFSB pour la validation des tests (Annexe 9). Bien qu'un nombre précis d'échantillons provenant du LEDP n'ait été défini à priori, malheureusement aucun échantillon utilisable n'a été reçu, ce qui a considérablement limité la possibilité de valider les tests avec des échantillons du terrain. C'est notamment le cas pour, le Rot blanc, la pourriture amère et la pourriture à maturité des baies (*Colletotrichum* sp.). Plusieurs appels aux agronomes ont été faits sans qu'aucun cas n'ait été trouvé. Des appels aux conseillers viticoles en Ontario et de l'OMAFRA ont aussi été faits et ce ne sont pas des maladies qu'ils observent en Ontario. Par contre, un peu moins de 50 cultures des différents champignons de la vigne ciblés par l'étude ont été partagées par le LEDP et ont contribué au développement des tests. Ces souches sont toujours en conservation à AAC.

Étape 4. Développement de nouveaux tests de détection de champignon pathogène et mutations liées à la résistance aux fongicides selon la méthode de séquençage par Nanopore.

Une preuve de concept de diagnostic par séquençage Nanopore des champignons et oomycètes pathogènes de la vigne a été complétée. Pour ces essais, la région ITS a été utilisée (région complète comprenant les régions ITS1, 5.8s et ITS2). Pour cette preuve de concept, les agents pathogènes de la vigne *E. ampelina*, *E. necator*, *G. bidwellii*, *P. viticola*, *G. uvicola*, *C. diplodiella*, *P. viticola*, *Botrytis pseudocinerea*, *B. cinerea* et *C. acutatum* ont été utilisés, en plus de trois pathogènes autres, soit *Alternaria dauci*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Neocercospora carotae*. Les espèces *C. gloeosporioides*, *C. viniferum* et *Pseudopezizicola tracheiphila* n'ont pu être ajoutées à cet essai, car aucune souche n'était disponible afin d'effectuer les réactions PCR nécessaires.

Les résultats obtenus lors de la première expérience (Figure 2) suggèrent que le séquençage d'amplicons ITS fonctionne très bien, et ce, pour la plupart des espèces testées. La résolution que donne le séquençage d'amplicons du gène ITS permet de bien identifier les espèces *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Coniella diplodiella*, *Diaporthe ampelina* (*Phomopsis viticola*), *Elsinoë ampelina*, *Plasmopara viticola* et *Greeneria uvicola* présentes dans la vigne, de même qu'*Alternaria dauci*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Neocercospora carotae*. Comme attendu, la région ITS, même entière, ne permet pas de distinguer *Botrytis cinerea* de *Botrytis pseudocinerea* (Figure 2). Les espèces ayant des séquences ITS très proches, comme *B. cinerea* et *B. pseudocinerea*, ont été regroupées en complexes d'espèces indissociables à partir de la seule région ITS (Van der Heyden et al. 2024). Par ailleurs, dans le cas de ces deux espèces de *Botrytis*, la gamme de plantes hôtes, l'épidémiologie et la recommandation qui pourrait être faite à un producteur suite au diagnostic n'est pas différente qu'il s'agisse de l'une ou l'autre des deux espèces, il n'y a donc peu ou pas de conséquence à regrouper ces espèces en complexe.

Nous n'avons pas été en mesure de détecter les espèces *Guignardia bidwellii* et *Plasmopara viticola* lors de ce premier essai, car l'ADN des souches utilisées pour la production d'amplicons était contaminé. Comme nous pouvons l'observer à la figure 3, en plus d'avoir obtenu peu de lectures, nous avons une forte contamination par des espèces du genre *Cladosporium*, *Botrytis* et *Alternaria* pour la souche de *G. bidwellii*. Nous avons aussi trouvé une forte contamination par des espèces du genre *Cladosporium* pour la souche de *P. viticola*. De plus, le témoin montrait une contamination importante (environ 50 000 lectures) qui semble également être composée des mêmes contaminants (*Cladosporium*, *Epicoccum* et *Alternaria*). Bien que ces contaminations n'étaient pas présentes dans les autres échantillons, nous avons décidé de reprendre l'essai avec un nouvel isolat de *P. viticola*.

Suite au second essai, nous avons été en mesure de réduire considérablement le nombre de contaminants dans le témoin, et de détecter *Plasmopara viticola* dans notre échantillon environnemental, ainsi que dans 4 prélèvements de spores sur lésions de mildiou (*P. viticola* 1 à 4) (Figure 4). Nous observons toujours une contamination dans les isolats de *P. viticola*, mais comme ce champignon est un parasite obligatoire, il est impossible de ne prélever que des spores de *P. viticola* sur les lésions, des pathogènes secondaires et opportunistes sont toujours présents dans ce type d'échantillon. Il devient donc normal de détecter d'autres espèces dans ces échantillons. Pour *G. bidwellii*, en plus de retrouver des contaminations, force est de constater que le nombre de lectures obtenues pour cet échantillon était très faible comparé aux autres (Figures 2 et 4 et 5). Sur gel, nous n'avons qu'une très faible bande, à peine perceptible, pour *G. bidwellii*, ce qui suggère que le problème ne provient pas du séquençage Nanopore, mais fort bien de la souche utilisée (Figure 5). Nous avons donc remis des souches en culture afin de reprendre les extractions et de nous assurer de la pureté et de l'identité de la souche utilisée. Ce travail de réisolation et de purification est toujours en cours (28/06/2024).

Le test de détection par séquençage Nanopore des champignons pathogènes de la vigne est en cours pour le gène *tefl*. L'amplification par PCR, le séquençage, l'appel de base, le démultiplexage, le rognage et la filtration ont été complétés. Les étapes suivantes n'ont pas été complétées, car nous sommes à curer la base de données pour le gène *tefl*.

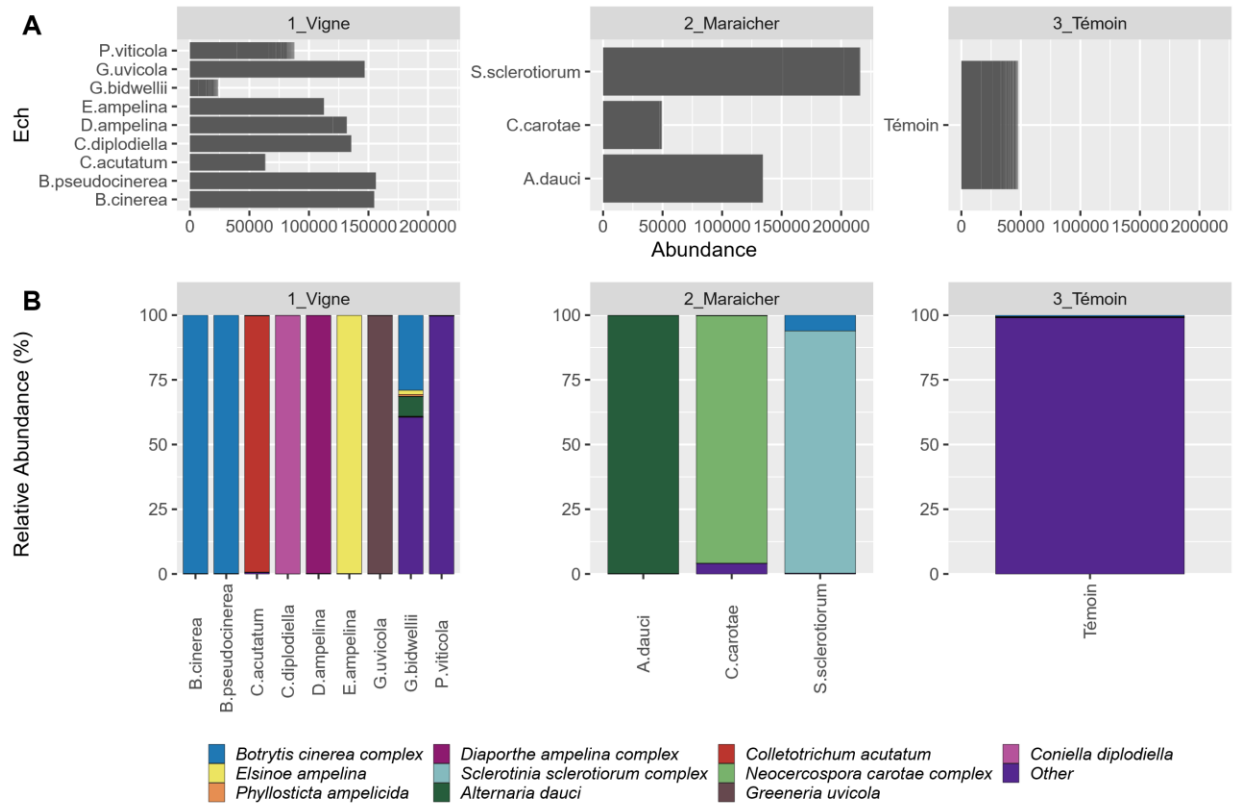


Figure 2 : Résultats du premier essai de séquençage d'amplicons ITS par nanopore, sur Mk1C, de 9 espèces pathogènes de la vigne et 3 espèces pathogènes de diverses cultures maraîchères. (A) Nombre de lectures obtenues par échantillon et (B) l'abondance relative des lectures associées aux espèces attendues pour chacun des échantillons.

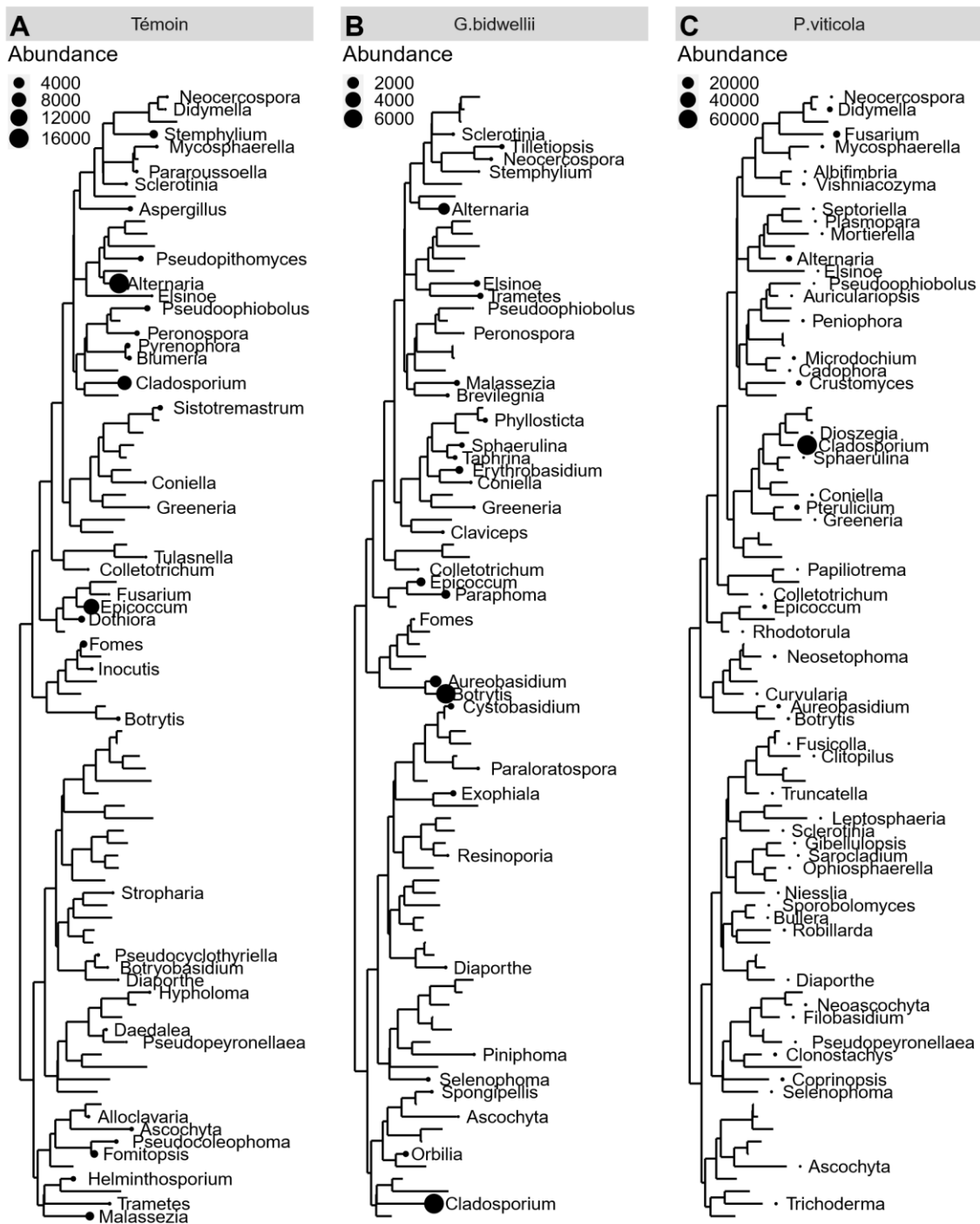


Figure 3 : Abondance des lectures associées aux différents genres fongiques retrouvés dans (A) le témoin, (B) l'isolat *Guignardia bidwellii* et (C) l'isolat *Plasmopara viticola* lors du premier essai de séquençage d'amplicons ITS sur *Mk1C*.

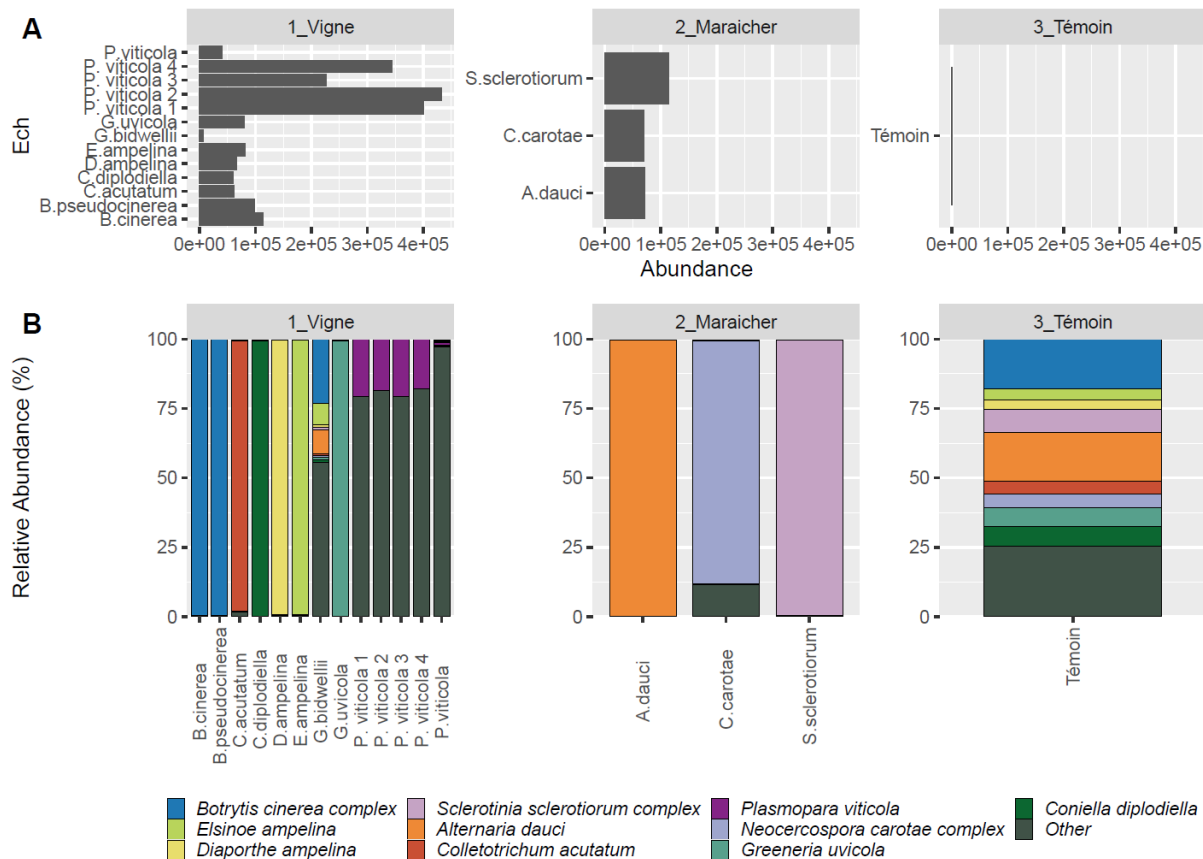


Figure 4 : Résultats du deuxième essai de séquençage d'amplicons ITS par nanopore, sur Mk1C, de 9 espèces pathogènes de la vigne et 3 espèces pathogènes de diverses cultures maraîchères. (A) Nombre de lectures obtenues par souche et (B) l'abondance relative des lectures associées aux espèces attendues pour chacune des souches.

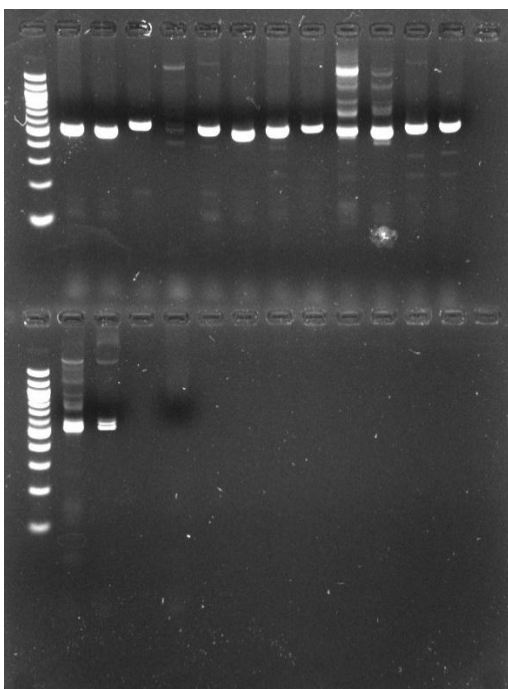


Figure 5 : Amplicons ITS sur gel d'agarose 1.2% pour le deuxième essai de séquençage Nanopore sur Mk1C. Première rangée, puit 1 : Échelle 100 pb. Puit 2 : *Botrytis cinerea*. Puit 3 : *Botrytis pseudocinerea*. Puit 4 : *Elsinoë ampelina*. Puit 5 : *Guignardia bidwellii*. Puit 6 : *Diaporthe ampelina*. Puit 7 : *Sclerotinia sclerotiorum*. Puit 8 : *Alternaria dauci*. Puit 9 : *Colletotrichum acutatum*. Puit 10 : *Plasmopara viticola*. Puit 11 : *Neocercospora carotae*. Puit 12 : *Greeneria uvicola*. Puit 13 : *Coniella diplodiella*. Deuxième rangée, puit 1 : Échelle 100 pb. Puit 2 : Pool de tous les ADN ajusté à 1 ng/μl. Puit 3 : Dilution 1/100 du pool de tous les ADN ajusté à 1 ng/μl. Puit 5 : Témoin sans ADN.

La résistance de *Botrytis* aux matières actives de différents fongicides est présentée dans le tableau IV.

Tableau IV : Familles de fongicides ciblés pour le développement des tests

Fongicide	Marqueur/gène	Amorces		
		Forward	Reverse	
SDHI resistance	sdhB gene	IpBcBeg	CCACTCCTCCATAATGGCTGCTCTCCGC	
		IpBcEnd2	CTCATCAAGCCCCCTCATTGATATC	
QoI resistance	cytb gene	Qo13ext	GGTATAACCCGACGGGGTTATAGAATAG	
		Qo14ext	AACCATCTCCATCCACCATACCTACAAA	
SBI resistance	Erg27 gene	erg27F1	CTTGTCAATGGAACTGTTGG	
		erg27R2	TAACCTTCAAAAGTCCCTCC	

Fongicide	Taille de l'amplicon	Remarques	Référence
SDHI resistance	950 pb	Gène complet	Leroux et al-2010
		P225F, P225L, P225T, H272L, H272R, H272Y, N230I	
QoI resistance	560 pb	Gène partiel	Fernandez-Ortuno et al-2012
		G143A, F129L, G137R, Intron	
SBI resistance	1225 pb	Gène partiel	P.-O. Hébert
		F412I, F412V, F412S, N369D, P427L	

Le test par séquençage nanopore pour la détection de mutations conférant la résistance à divers fongicides a été développé pour le champignon modèle *B. cinerea*. Une base de données pour les mutations liées à la résistance aux fongicides chez *B. cinerea* a été compilée. Celle-ci couvre plus de 20 mutations sur les gènes *sdhB*, *cytb*, *β -tubuline*, *bos1* ainsi que *erg27*. Plus de 200 souches de *Botrytis cinerea* caractérisées pour la présence de ces différentes mutations ont été utilisées pour les essais, dont la création de communautés artificielles constituées de souches ayant des mutations connues. Pour la preuve de concept, nous avons choisi de nous attarder aux gènes *sdhB*, *cytb* et *erg27*, car ceux-ci sont la cible de fongicides du groupe 7, 11 et 17 respectivement, et que ces groupes de fongicides sont toujours homologués au Québec, contrairement aux groupes qui ciblent les gènes *β -tubuline* et *bos1*. L'essai est en cours. L'amplification par PCR, le séquençage, l'appel de base, le démultiplexage, le rognage et la filtration ont été complétés. Les étapes suivantes n'ont pas été complétées, car nous sommes à développer les scripts requis pour l'analyse de SNPs.

Le protocole détaillé de détection par Nanopore est présenté en Annexe 6.

Étape 5 Adapter les tests de diagnostics moléculaires pour le prédiagnostic au champ ou dans des laboratoires de proximité.

Test de LAMP déployable sur le terrain pour *Botrytis cinerea*

Le test d'amplification isothermique par boucle (LAMP) est une méthode d'amplification de l'acide nucléique qui amplifie l'ADN de façon très spécifique, qui est efficace et rapide dans des conditions isothermiques (mêmes températures). La méthode utilise une ADN polymérase et un ensemble de quatre à six amorces spécialement conçues pour reconnaître 6 à 8 régions distinctes sur l'ADN cible avec amplification à température constante. Il est donc possible d'effectuer le test avec un minimum d'équipement et donc soit sur le terrain ou dans un laboratoire de proximité (espace dédié).

Le test LAMP présente un avantage significatif par rapport aux tests standards de type ELISA ou PCR en ce qui concerne le diagnostic en champ, le temps requis pour obtenir les résultats, la simplicité des manipulations, et la spécificité (coût comparable à ELISA). L'utilisation d'un test LAMP nécessite moins d'expertise que les tests ELISA, PCR et qPCR. Les conseillers pourraient intégrer les tests LAMP pour un prédiagnostic (vérification éventuelle par un laboratoire avec expertise reconnue) ou carrément un diagnostic au champ.

Des essais d'amplification isothermique (LAMP) sensibles et spécifiques à médiation de boucle pour *Botrytis cinerea*, le champignon responsable de la moisissure grise, ont récemment été mis au point par Tomlinson et al. (2010) (Annexe 5). Dans le cadre de ce projet, nous avons optimisé et adapté le test LAMP proposé par Tomlinson et al. (2010) et effectué les tests de spécificité. Au cours de la saison estivale de 2023, deux démonstrations ont été effectuées à la ferme expérimentale d'Agriculture et Agroalimentaire Canada. Lors des portes ouvertes « Journée vitrine vignoble de Frelighsburg » le 12 juillet 2023 (environ 75 participants). Le protocole est présenté en Annexe 5.

Des tests LAMP existent pour plusieurs champignons et autres agents phytopathogènes de la vigne ainsi que pour la détection de certaines mutations associées à la résistance aux fongicides et pourraient être optimisés. L'utilisation des tests LAMP comporte des avantages comme mentionné, mais également des désavantages. Essentiellement, il faut redesigner les tests et on ne peut pas utiliser les amorces disponibles pour les tests en qPCR. De plus, les tests LAMP sont essentiellement pour la détection (présence/absence), la quantification n'est pas précise, possiblement en catégories soit le pathogène est absent, en faible, moyenne, ou grande quantité.

DIFFUSION DES RÉSULTATS

Présentation aux utilisateurs (agronomes, conseillers et producteurs)

1. Provost. C. 2021. État des projets de recherche en phytoprotection et régie de culture en viticulture au CRAM. Séance d'échange sur la recherche en viticulture et œnologie (SERVO), 8-9 avril 2021.
2. Provost. C. 2022. Gestion des ravageurs en vignoble: nouvelles pistes de solutions pour lutter contre le scarabée japonais, les maladies fongiques et les mauvaises herbes. Séance d'échange sur la recherche en viticulture et œnologie (SERVO), 7-8 avril 2022.
3. Discussion du projet lors du bilan fin de saison RAP vigne 2022, tenu le 22 novembre 2022. Cette rencontre regroupe les agronomes et les conseillers en viticulture et d'autres intervenants, dont le LEDP et des chercheurs.
4. Discussion du projet lors du bilan fin de saison RAP vigne 2023, tenu le 27 novembre 2023. Cette rencontre regroupe les agronomes et les conseillers en viticulture et d'autres intervenants, dont le LEDP et des chercheurs.
5. Deux démonstrations de l'utilisation du LAMP ont été effectuées à la journée PAD Journée vitrine vignoble de Frelighsburg à la ferme expérimentale d'Agriculture et agroalimentaire Canada, le 12 juillet 2023.

La fiche synthèse et le rapport final seront diffusés sur le site internet du CRAM et dans la section vigne de AgriRéseau.

Tous les protocoles ont été transférés au LEDP.

ACTIVITÉS DE DIFFUSION ET TRANSFERT AUX UTILISATEURS

Les premiers résultats ont permis de déterminer les éléments optimaux pour l'extraction de l'ADN à partir de différentes parties de la vigne. Des protocoles qPCR en simplex et multiplex ont été développés, validés puis envoyés au LEDP en continu à partir de l'hiver 2020-2021 pour vérification dans leurs conditions de laboratoire avec leurs équipements spécifiques. Les phases subséquentes ont permis de commencer le développement des techniques de séquençage par Nanopores. Les techniques de séquençage par Nanopore ont aujourd'hui atteint une maturité technologique suffisante pour pouvoir être comparée aux techniques déjà existantes. Les avantages de cette méthode sont sa capacité à réaliser la lecture de longs fragments, ce qui réduit fortement le travail post-séquençage d'alignement, et aussi la possibilité de construire des dispositifs expérimentaux à la fois moins coûteux et portatifs. Un protocole utilisant la technologie LAMP a aussi été développé. Le transfert des divers protocoles au LEDP ainsi que la collaboration entre les équipes de recherche du LEDP, AAC, l'INRS-AFSB et du CRAM ont permis le développement et la mise à niveau de protocoles de détection de plusieurs maladies

fongiques dans la vigne et permet ainsi au LEDP d'offrir un service d'analyse de détection précis, fiable et rapide aux producteurs et intervenants de la vigne.

POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Nom du responsable du projet : Dr. Caroline Provost
Téléphone : 450-434-8150 #26064
Courriel : cprovost@cram-mirabel.com



REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ce projet a été réalisé en vertu du sous-volet 2.2 du programme Prime-Vert 2018-2023 et il a bénéficié d'une aide financière du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ).

RÉFÉRENCES

- Carisse, O., Tremblay, D.M. and Lefebvre, A. (2014), Comparison of *Botrytis cinerea* airborne inoculum progress curves from raspberry, strawberry and grape plantings. Plant Pathol, 63: 983-993. <https://doi.org/10.1111/ppa.12192>
- O. Carisse, H. Van der Heyden, D. M. Tremblay, P. O. Hébert, and F. Delmotte. 2021. Evidence for Differences in the Temporal Progress of *Plasmopara viticola* Clades *riparia* and *aestivalis* Airborne Inoculum Monitored in Vineyards in Eastern Canada Using a Specific Multiplex Quantitative PCR Assay. Plant Disease 2021 105:6, 1666-1676
- Fernández-Ortuño, D., Chen, F., and Schnabel, G. 2012. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. Plant Dis. 96:1198-1203.
- Leroux, P., Gredt, M., Lerouch, M., & Walker, A-S. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. Appl. Environ. Microbiol. 76, 6615–6630.
- Martinez-Culebras, P.V., Querol, A., Suarez-Fernandez, M.B., Garcia-Lopez, M.D. and Barrio, E. (2003), Phylogenetic Relationships Among *Colletotrichum* Pathogens of Strawberry and Design of PCR Primers for their Identification. Journal of Phytopathology, 151: 135-143. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00694.x>
- Ozaki, K. 2021. Développement et mise à niveau de méthodes de détection des champignons pathogènes des tissus ligneux de la vigne. Mémoire. INRS-Institut Armand -Frappier.
- Samuelian SK, Greer LA, Savocchia S, Steel CC. Detection and Monitoring of *Greeneneria uvicola* and *Colletotrichum acutatum* Development on Grapevines by Real-Time PCR. Plant Dis. 2011 Mar;95(3):298-303. doi: 10.1094/PDIS-07-10-0537. PMID: 30743504.
- Tomlinson JA, Dickinson MJ, Boonham N. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. 2010 Lett Appl Microbiol. Dec;51(6):650-7. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02949.x. Epub 2010 Oct 12. PMID: 21029140.
- Van der Heyden H, Duceppe MO, Charron G, Tanguay P, and, Bilodeau GJ. 2024 Oomycetes Communities are Influenced by Land Use and Disease Status in Christmas Tree Production in Southern Québec, Canada. Environmental DNA, In press.

ANNEXE 1 : Protocole qPCR

Dans cette annexe, vous trouverez tous les protocoles qPCR (simplex et multiplex) développés dans ce projet. Dans la section « Spécificité », les organismes cités correspondent aux organismes testés, et auxquels il n'y a pas eu d'amplification, sauf indications contraires. Si les sections « Sensibilité » et « Spécificité » ne sont pas mentionnées, c'est que ces essais n'ont pas été effectués pour ce système.

- 1.1 Simplex *Elsinoë ampelina*
- 1.2 Simplex *Erysiphe necator*
- 1.3 Simplex *Guignardia bidwellii*
- 1.4 Simplex *Phomopsis viticola*
- 1.5 Simplex *Greeneria uvicola* (SYBR Green)
- 1.6 Simplex *Greeneria uvicola* (TaqMan)
- 1.7 Simplex *Pilidiella diplodiella*
- 1.9 Simplex *Plasmopara viticola* (*riparia*)
- 1.10 Simplex *Plasmopara viticola* (*aestivalis*)
- 1.11 Simplex *Plasmopara viticola* (*vinifera*)
- 1.12 Simplex *Botrytis cinerea*
- 1.13 Simplex *Botrytis pseudocinerea*
- 1.14 Simplex *Colletotrichum acutatum*
- 1.15 Simplex *Colletotrichum gloeosporioides*
- 1.16 Simplex *Colletotrichum viniferum*
- 1.17 Triplex *Plasmopara viticola riparia*, *P.v. aestivalis*, *P.v. vinifera*
- 1.18 Duplex *Botrytis cinerea* et *Botrytis pseudocinerea*
- 1.19 Duplex *Elsinoë ampelina* et *Guignardia bidwellii*
- 1.20 Triplex *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* et *C. viniferum*

Annexe 1.1

Ce qPCR a été développé sur le gène ITS. Il est spécifique à *Elsinoe ampelina*.

Détection d'*Elsinoë ampelina* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce forward : EaF1 5'-GGACCGAACCAACTCTTT-3'

Amorce Reverse : EaR1 5'-TCTGGCATCGATGAAGAACG-3'

Sonde : EaP1 5'-TGCAGTCGGAGTACAACGTACAT-3' → PrimeTime 5' 6-FAM/ZEN/3' IBFQ (Integrated DNA Technologies) Le fluorophore peut être changé

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil qPCR Agilent AriaMx (1 :200 dilution pour ROX)

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 µM pour chacune des amorces ainsi que 5 µM pour la sonde.
3. Préparer le mix « 20x primer-probe mix » à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 µM pour chacune des amorces, et 0,25 µM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 µl. Multiplier selon le nombre d'échantillon. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
QN ROX Reference Dye	1x	0,10
20x primer-probe mix (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	10,90
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Sensibilité

Ce système peut détecter jusqu'à 1.5 fg d'ADN dans les conditions décrites dans ce protocole.

Spécificité

Botrytis cinerea

Botrytis pseudocinerea

Guignardia bidwellii

Alternaria dauci

Cercospora carotae

Sclerotinia sclerotiorum

Annexe 1.2

Ce qPCR a été développé sur le gène ITS. Il est spécifique à *Erysiphe necator*.

Détection d'*Erysiphe necator* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce sens : EnITS2F 5'- ACGCGTAGTAACTTGTTTC -3'

Amorce anti-sens : EnITS1R 5'- GAGGTCAACCTGTCAATC -3'

Sonde : EnITS2P 5'- TCGTGATCAGCCAGAACCACC -3' → PrimeTime 5' 6-Cy5/TAO/3' IBRQ (Integrated DNA Technologies) Le fluorophore peut être changé

Développé avec le Master Mix QuantiFast Multiplex PCR +R Kit (Qiagen cat. nos. 20475 - 4|6|7)

Développé dans l'appareil Agilent AriaMx

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 µM pour chacune des amorces ainsi que 5 µM pour la sonde.
3. Préparer le mix « 20x primer-probe mix » à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 µM pour chacune des amorces, et 0,25 µM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 µl. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
QN ROX Reference Dye	1x	0,10
20x primer-probe mix (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	10,90
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Spécificité

Botrytis cinerea

Botrytis pseudocinerea

Plasmopara viticola

Elsinoë ampelina

Sensibilité

Avec ce système, il est possible de détecter jusqu'à une spore de *E. necator*.

Annexe 1.3

Ce qPCR a été développé sur le gène ITS. Il est spécifique à *Guignardia bidwellii*.

Détection de *Guignardia bidwellii* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce forward : GbF1 5'-GAAAAGCCGTCCGAAAGA-3'

Amorce Reverse : GbR1 5'-CAGGACTTCACGAAATAATCG-3'

Sonde : GbP1 5'-CCTTACCATGTTGCTTTGGCGG-3' → PrimeTime 5' 6-Cy5/ZEN/3'

IBFQ (Integrated DNA Technologies) Le fluorophore peut être changé

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil qPCR Agilent AriaMx (1 :200 dilution pour ROX)

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 µM pour chacune des amorces ainsi que 5 µM pour la sonde.
3. Préparer le mix « 20x primer-probe mix » à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 µM pour chacune des amorces, et 0,25 µM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 µl. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
QN ROX Reference Dye	1x	0,10
20x primer-probe mix (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	10,90
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Sensibilité

Ce système peut détecter jusqu'à 30 fg d'ADN dans les conditions décrites dans ce protocole.

Spécificité

Botrytis cinerea

Botrytis pseudocinerea

Guignardia bidwellii

Alternaria dauci

Cercospora carotae

Sclerotinia sclerotiorum

Annexe 1.4

Ce qPCR a été développé sur le gène ITS. Il est spécifique à *Phomopsis viticola*.

Détection de *Phomopsis viticola* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

BSA

MgCl₂

Eau stérile sans nucléase

Amorce sens : ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3'

Amorce anti-sens : ITS2 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'

Sonde : PHO1 5'-(ACTCATACCTTACCGTTGCCTCGG -3' → Fluorophore 5' HEX et Quencher 3'MGB (Alpha DNA – le fluorophore et le quencher peuvent être changés)

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil Corbett Rotor Gene 6000.

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Diluer les amorces à une concentration de 10 µM pour chacune des amorces.
3. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 µl. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réactif	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	5
Amorce sens	1
Amorce anti-sens	1
Sonde	0,4
Rnase-free water	6
MgCl ₂	1,6
BSA	0,5

****Protocole développé pour le Corbett Rotor Gene 6000, donc pas besoin du QN ROX reference dye. À ajouter au besoin en concentration finale 1x****

4. Distribuer 15 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 5 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
5. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
6. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
7. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 64°C (40 cycles)

Spécificité (données tirées du mémoire de Koyomi Ozaki) : *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Eutypa lata*, *Botryosphaeria dothidae*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Cylindrocarpon liriodendri*, *Cylindrocarpon macrodidymum*, *Cylindrocarpon pauciseptatum*

Sensibilité (données tirées du mémoire de Koyomi Ozaki) : Il est possible de détecter jusqu'à 3×10^{-4} ng/ul d'ADN provenant d'une souche pure de *P. viticola*.

Annexe 1.5

Ce qPCR a été développé sur le gène ITS. Ce système utilise la détection par SYBR Green. Il est spécifique à *Greeneria uvicola*.

Détection de *Greeneria uvicola* par qPCR (SYBR Green) (basé sur Samuellan et al., 2011)

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

0,1ml «PCR strip tube with cap»

Support cryogénique à tubes

Centrifugeuse

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

PerfeCta SYBR Green FastMix

Eau stérile sans nucléase

Amorces

Amorce sens GuF2b : 5'- TCTGAACGTATCTCTTCTGAG -3'

Amorce anti-sens GuR2 : 5'- TAAGTCAACCTAAGCGAGAAG-3'

Développé avec le Master Mix PerfeCta SYBR Green FastMix (Quantabio cat. No. 95072-250)

Développé dans l'appareil Corbett Rotor Gene 6000

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Diluer les amorces à une concentration de 10 μ M pour chacune des amorces.
3. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 μ l. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réactif	Volume (μ l)
2x Multiplex PCR Master Mix	10,00
Amorce sens	0,4
Amorce anti-sens	0,4
Rnase-free water	4,2
Template DNA	5,00

4. Distribuer 15 μ l de master mix par tube et y ajouter ensuite 5 μ l d'ADN. Faire quelques «up and down» à l'aide de la pipette pour mélanger l'ADN et le master Mix. Nous suggérons de déposer les tubes dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR. Protéger les tubes de la lumière.

5. Centrifuger les tubes 1 min à 3000 x g.
6. Déposer les tubes dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait lors de l'élongation à chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 94°C
Amplification	30 sec, 94°C ; 30 sec, 60°C; 60 sec, 72°C (40 cycles)

7. Faire une *melting curve* avec une rampe de 62°C à 94°C avec une augmentation de 1°C par étape durant 5 secondes afin de confirmer l'amplification adéquate. Vérifier également l'efficacité de la réaction (entre 0,9 et 1,0).

Sensibilité : Ce système peut détecter 20 fg d'ADN génomique ou 10 conidies (Samuellan et al., 2011)

Spécificité : Plusieurs souches de *Greeneria uvicola*, *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis spp.*, *Erysiphe necator* (dans l'étude de Samuellan et al., 2011). Nous avons également fait des validations *in silico* confirmant la spécificité des amorces pour *G. uvicola*.

Annexe 1.6

Ce qPCR a été développé sur le gène ITS. Il est spécifique à *Greeneria uvicola*.

Détection de *Greeneria uvicola* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce sens : GuF2b 5'- TCTGAACGTATCTCTTCTGAG -3'

Amorce anti-sens : GuR2 5'- TAAGTCAACCTAAGCGAGAAG -3'

Sonde : Gu_P 5'- AAGCTCCCGTGCTTGGT -3' → Fluorophore 5' HEX et Quencher 3'MGB (Alpha DNA – le fluorophore et le quencher peuvent être changés)

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil Corbett Rotor Gene 6000

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 μ M pour chacune des amorces ainsi que 5 μ M pour la sonde.
3. Préparer le mix « 20x primer-probe mix » à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 μ M pour chacune des amorces, et 0,25 μ M pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 μ l. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
20x primer-probe mix (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	11
Template DNA	Variable	3,00

Protocole développé pour le Corbett Rotor Gene 6000, donc pas besoin du QN ROX reference dye. À ajouter au besoin en concentration finale 1x

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Sensibilité : essai sensible avec un ct de 6 lorsque testé avec les souches pures disponibles.

Spécificité : Amorces déjà testées dans l'étude de Samuellan et al., 2011. La spécificité de la sonde a été testée *in silico* et est spécifique à *G. uvicola*.

Annexe 1.7

Ce qPCR a été développé sur le gène H3. Il est spécifique à *Pilidiella diplodiella*.

Détection de *Pilidiella diplodiella* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce sens : Pd_H3_F1: 5' TATTTATCTGCACCGCTCTTGG 3'

Amorce anti-sens : Pd_H3_R1: 5' GAAGACATAGAGCAATGTGGTAA 3'

Sonde : PdH3_P 5'- CGCTCCTTCTCAGGTTCGT -3' → Fluorophore 5' HEX et Quencher 3'MGB (Alpha DNA – le fluorophore et le quencher peuvent être changés)

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil Corbett Rotor Gene 6000

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 μ M pour chacune des amorces ainsi que 5 μ M pour la sonde.
3. Préparer le mix « 20x primer-probe mix » à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 μ M pour chacune des amorces, et 0,25 μ M pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 μ l. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
20x primer-probe mix (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	11
Template DNA	Variable	3,00

Protocole développé pour le Corbett Rotor Gene 6000, donc pas besoin du QN ROX reference dye. À ajouter au besoin en concentration finale 1x

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Spécificité : Cet essai est spécifique à *P. diplodiella* puisque la spécificité a été confirmée par une librairie de séquençage réalisée dans des sols de vignes et les 10 ASV identifiés étaient tous *P. diplodiella*.

Sensibilité : Système assez sensible avec un ct de 13 lorsque testé avec les souches pures disponibles.

Annexe 1.9

Ce qPCR a été développé sur le gène ITS. Il est spécifique à *Plasmopara viticola riparia*.

Détection de *Plasmopara viticola riparia* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce sens : 5'- GGATCATTACCACACCTAAAAC -3'

Amorce anti-sens : 5'- TAGCTGCAACCACCGA -3'

Sonde : 5'- AGTTATCGCTGCCTATTTCAT -3'*** → PrimeTime 5' 6-FAM/ZEN/3' IBFQ
(Integrated DNA Technologies)

***Les bases soulignées représentent des « locked nucleic acids (LNA) »

Développé avec le Master Mix QuantiFast Multiplex PCR +R Kit (Qiagen cat. no. 20475 - 4|6|7)

Développé dans l'appareil Agilent AriaMx

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 µM pour chacune des amorces ainsi que 5 µM pour la sonde.
3. Préparer le mix « 20x primer-probe mix » à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 µM pour chacune des amorces, et 0,25 µM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases. Pour *P. viticola viniferum*, ajouter seulement la sonde dans le mix, à raison de 0.25 µM.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 µl. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
20x primer-probe mix (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	11,00
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Spécificité

Plasmopara viticola aestivalis

Plasmopara viticola vinifera

Plasmopara halstedii

Plasmopara nivea

Plasmopara obducens

Plasmopara densa

Plasmopara euphrasiae

Plasmopara geranii-sylvatici

Plasmopara geranii
Plasmopara pusilla
Plasmopara wilsonii
Plasmopara praetermissa
Plasmopara chaerophylli
Paraperonospora tanacetii
Bremia lactucae
Peronospora destructor
Pseudoperonospora cubensis
Phytophthora infestans
Erysiphe necator
Botrytis cinerea
Elsinoë ampelina

Sensibilité

Avec ce système, il est possible de détecter aussi peu qu'une spore de *P. viticola riparia*.

Annexe 1.10

Ce qPCR a été développé sur le gène ITS. Il est spécifique à *Plasmopara viticola aestivalis*.

Détection de *Plasmopara viticola aestivalis* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce sens : 5'- GGTTGTTAGACTTTGTGATTAGTAA -3'

Amorce anti-sens : 5'- GGCAGAAAGCATACTATATAAGC -3'

Sonde : 5'- CTCGACAAACAAACCGGGA -3'*** → PrimeTime 5' 6-Cy5/TAO/3' IBRQ
(Integrated DNA Technologies)

***Les bases soulignées représentent des « locked nucleic acids (LNA) »

Développé avec le Master Mix QuantiFast Multiplex PCR +R Kit (Qiagen cat. no. 20475 - 4|6|7)

Développé dans l'appareil Agilent AriaMx

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 µM pour chacune des amorces ainsi que 5 µM pour la sonde.
3. Préparer le mix « 20x primer-probe mix » à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 µM pour chacune des amorces, et 0,25 µM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases. Pour *P. viticola viniferum*, ajouter seulement la sonde dans le mix, à raison de 0.25 µM.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 µl. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
20x primer-probe mix (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	11,00
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Spécificité

Plasmopara viticola riparia

Plasmopara viticola vinifera

Plasmopara halstedii

Plasmopara nivea

Plasmopara obducens

Plasmopara densa

Plasmopara euphrasiae

Plasmopara geranii-sylvatici

Plasmopara geranii

Plasmopara pusilla

Plasmopara wilsonii
Plasmopara praetermissa
Plasmopara chaerophylli
Paraperonospora tanacetii
Bremia lactucae
Peronospora destructor
Pseudoperonospora cubensis
Phytophthora infestans
Erysiphe necator
Botrytis cinerea
Elsinoë ampelina

Sensibilité

Avec ce système, il est possible de détecter aussi peu qu'une spore de *P. viticola aestivalis*.

Annexe 1.11

Ce qPCR a été développé sur le gène ITS. Ce système s'utilise en multiplex avec les autres systèmes pour la détection de *Plasmopara viticola riparia* et *aestivalis*. Il s'agit d'une sonde spécifique à *Plasmopara viticola vinifera* qui utilise les mêmes amorces que *Plasmopara viticola aestivalis*. Ce système a été testé à partir de gBlocks puisque ce clade n'est pas encore présent au Québec.

Détection de *Plasmopara viticola vinifera* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Sonde : 5'- TAATGCCTCAACAATCAAACCG -3'*** → PrimeTime 5' TEX 615/3' IBRQ (Integrated DNA Technologies)

Le système pour *P. viticola vinifera* utilise les mêmes amorces que pour *P. viticola aestivalis*. Il n'est cependant pas nécessaire d'en commander plus.

***Les bases soulignées représentent des « locked nucleic acids (LNA) »

Développé avec le Master Mix QuantiFast Multiplex PCR +R Kit (Qiagen cat. no. 20475 - 4|6|7)

Développé dans l'appareil Agilent AriaMx

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 µM pour chacune des amorces ainsi que 5 µM pour la sonde.
3. Préparer le mix « 20x primer-probe mix » à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 µM pour chacune des amorces, et 0,25 µM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases. Pour *P. viticola viniferum*, ajouter seulement la sonde dans le mix, à raison de 0.25 µM.

4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 μ l. Multiplier selon le nombre d'échantillon. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (μ l)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
20x primer-probe mix (amorces sens et anti-sens (8 μ M chacune) et sonde (5 μ M) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 μ M Sonde: 0,25 μ M	1,00
Rnase-free water	-	11,00
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 μ l de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 μ l d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Spécificité

Plasmopara viticola riparia
Plasmopara viticola vinifera
Plasmopara halstedii
Plasmopara nivea
Plasmopara obducens
Plasmopara densa

Plasmopara euphrasiae
Plasmopara geranii-sylvatici
Plasmopara geranii
Plasmopara pusilla
Plasmopara wilsonii
Plasmopara praetermissa
Plasmopara chaerophylli
Paraperonospora tanacetii
Bremia lactucae
Peronospora destructor
Pseudoperonospora cubensis
Phytophthora infestans
Erysiphe necator
Botrytis cinerea
Elsinoë ampelina

Sensibilité

Ce système est capable de détecter jusqu'à 6 copies du gène ITS présent chez *P. viticola* *vinifera* (environ 1 spore).

Annexe 1.12

Ce qPCR a été développé sur le gène IGS. Il est spécifique à *Botrytis cinerea*.

Détection en multiplex de *Botrytis cinerea* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce sens : Bc3igsFmCUT 5'- GCTGTAATTTCAATGTGCAGAATC-3'

Amorce anti-sens : Bc3igsR 5'- GGAGCAACAATTAATCGCATTTC-3'

Sonde : Bc3igsP 5'- TCACCTTGCAATGAGTGG -3' → PrimeTime 5' 6-FAM/ZEN/3' IBFQ
(Integrated DNA Technologies)

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil qPCR Agilent AriaMx (1 :200 dilution pour ROX)

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 µM pour chacune des amorces ainsi que 5 µM pour la sonde.
3. Préparer les mix « 20x primer-probe mix » pour chacun des systèmes à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 µM pour chacune des amorces, et 0,25 µM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 µl. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
QN ROX Reference Dye	1x	0,10
20x primer-probe mix <i>B. cinerea</i> (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	10,90
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Spécificité

Botrytis elliptica

Botrytis fabae

Botrytis narcissicola

Botrytis tulipae

Alternaria brassica

Cladosporium sp.

Colletotrichum gloeosporioides

Fusarium avenaceum

Fusarium Culmorum

Penicillium sp.

Pythium sp.

Sclerotinia sclerotiorum

Botrytis pseudocinerea

Plasmopara viticola riparia

Plasmopara viticola aestivalis

Plasmopara viticola vinifera

Erysiphe necator

Sensibilité

Ce système est capable de détecter jusqu'à 2.7 fg d'ADN de *Botrytis cinerea*.

Annexe 1.13

Ce qPCR a été développé sur le gène ITS. Il est spécifique à *Botrytis pseudocinerea*.

Détection en multiplex de *Botrytis pseudocinerea* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce forward : B.pseudo3F 5'- ATGGCTCTCCAAAGATCA-3'

Amorce Reverse : B.pseudo3R 5'-CCACGTTCTTTACGGTCT -3'

Sonde : B.pseudo3P 5'- GTTTGTGAAACTCCCGGCTA-3' → PrimeTime 5' Cy5 / TAO/ 3'

IBRQ (Integrated DNA Technologies)

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil qPCR Agilent AriaMx (1 :200 dilution pour ROX)

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 µM pour chacune des amorces ainsi que 5 µM pour la sonde.
3. Préparer les mix « 20x primer-probe mix » pour chacun des systèmes à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 µM pour chacune des amorces, et 0,25 µM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 µl. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
QN ROX Reference Dye	1x	0,10
20x primer-probe mix <i>B. pseudocinerea</i> (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	10,90
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Spécificité

Botrytis cinerea
Plasmopara viticola riparia
Plasmopara viticola aestivalis
Elsinoë ampelina
Guignardia bidwellii
Alternaria dauci
Cercospora carotae
Sclerotinia sclerotiorum

Sensibilité

Ce système peut détecter jusqu'à 300 fg d'ADN de *Botrytis pseudocinerea*.

Annexe 1.14

Ce qPCR a été développé sur le gène *klap1*. Les amorces ont été développées par Azevedo-Nogueira et al., 2021, et la sonde dans ce projet. Il est spécifique à *Colletotrichum acutatum* et *Colletotrichum fioriniae*.

Détection de *Colletotrichum acutatum* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce sens : CacutF3 5'-GCCAACAAATAAACGCCACT -3'

Amorce anti-sens : CacutR3 5'-GACTTATTCGGTGACGTGCC -3'

Sonde : CacutP3 5'-TCTCGCCTGTCTGAGGAGAACGCA-3' → PrimeTime 5' 6-FAM/ZEN/3' IBFQ (Integrated DNA Technologies)

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil qPCR Agilent AriaMx (1 :200 dilution pour ROX)

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 μ M pour chacune des amorces ainsi que 5 μ M pour la sonde.
3. Préparer les mix « 20x primer-probe mix » pour chacun des systèmes à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 μ M pour chacune des amorces, et 0,25 μ M pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 μ l. Multiplier selon le nombre d'échantillon. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
QN ROX Reference Dye	1x	0,10
20x primer-probe mix <i>C. acutatum</i> (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	10,90
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Sensibilité

Ce système peut détecter jusqu'à 0.009 ng d'ADN dans les conditions décrites dans ce protocole.

Spécificité

Colletotrichum dematium
Colletotrichum coccodes
Colletotrichum lineola
Colletotrichum godetiae
Colletotrichum nymphae

Colletotrichum brassicae
Colletotrichum graminicola
Colletotrichum orchidophilum
Colletotrichum fioriniae (positif avec système *acutatum*)

Annexe 1.15

Ce qPCR a été développé sur le gène β -tubulin. Il est spécifique à *Colletotrichum gloeosporioides*, mais n'a seulement été testé qu'à partir de gBlocks, faute d'avoir des isolats ou de l'ADN disponible au Québec.

Détection de *Colletotrichum gloeosporioides* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce forward : CgloeF 5'- CCATCACCACAAATCACA -3'

Amorce Reverse : CgloeR 5'- GAGGTCGATGATTGACAG -3'

Sonde : CgloeP 5'- TTGCGACGCGTTTATCCGCCCT -3' → PrimeTime 5' Cy5/TAO/3'

IBRQ (Integrated DNA Technologies)

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil qPCR Agilent AriaMx (1 :200 dilution pour ROX)

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 μ M pour chacune des amorces ainsi que 5 μ M pour la sonde.
3. Préparer les mix « 20x primer-probe mix » pour chacun des systèmes à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 μ M pour chacune des amorces, et 0,25 μ M pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 μ l. Multiplier selon le nombre d'échantillon. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
QN ROX Reference Dye	1x	0,10
20x primer-probe mix <i>C. gloeosporioides</i> (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	10,90
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Sensibilité

Ce système peut détecter jusqu'à 0.3 fg d'ADN synthétique (gBlocks) dans les conditions décrites dans ce protocole.

Spécificité

Colletotrichum dematium
Colletotrichum coccodes
Colletotrichum lineola
Colletotrichum godetiae
Colletotrichum nymphae

Colletotrichum brassicae
Colletotrichum graminicola
Colletotrichum orchidophilum
Colletotrichum fioriniae

Annexe 1.16

Ce qPCR a été développé sur le gène GAPDH. Il est spécifique à *Colletotrichum viniferum*, mais n'a seulement été testé qu'à partir de gBlocks, faute d'avoir des isolats ou de l'ADN disponible au Québec.

Détection de *Colletotrichum viniferum* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce forward : CviniF 5'- CATTGAGACCAAGTACGCT -3'

Amorce Reverse : CviniR 5'- CGAGATGTAGATGACAGCG-3'

Sonde : CviniP 5'- TATCCCTCCAAACTCGCCATGA -3' → PrimeTime 5' HEX/ZEN/3' IBRQ (Integrated DNA Technologies)

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil qPCR Agilent AriaMx (1 :200 dilution pour ROX)

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 µM pour chacune des amorces ainsi que 5 µM pour la sonde.
3. Préparer les mix « 20x primer-probe mix » pour chacun des systèmes à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 µM pour chacune des amorces, et 0,25 µM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 µl. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
QN ROX Reference Dye	1x	0,10
20x primer-probe mix <i>C. viniferum</i> (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	10,90
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Sensibilité

Ce système peut détecter jusqu'à 0.03 fg d'ADN synthétique (gBlocks) dans les conditions décrites dans ce protocole.

Spécificité

Colletotrichum dematium
Colletotrichum coccodes
Colletotrichum lineola
Colletotrichum godetiae
Colletotrichum nymphae

Colletotrichum brassicae
Colletotrichum graminicola
Colletotrichum orchidophilum
Colletotrichum fioriniae

Annexe 1.17

Ce triplex comprend les simplex développés pour *Plasmopara viticola riparia*, *Plasmopara viticola aestivalis* et *Plasmopara viticola vinifera*.

Détection de *Plasmopara viticola* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

P. viticola riparia

Amorce sens : 5'- GGATCATTACCACACCTAAAAC -3'

Amorce anti-sens : 5'- TAGCTGCAACCACCGA -3'

Sonde : 5'- AGTTATCGCTGCCTATTTCAT -3'*** → PrimeTime 5' 6-FAM/ZEN/3' IBFQ
(Integrated DNA Technologies)

P. viticola aestivalis

Amorce sens : 5'- GGTTGTTAGACTTTGTGATTAGTAA -3'

Amorce anti-sens : 5'- GGCAGAAAGCATACTATATAAGC -3'

Sonde : 5'- CTCGACAAACAACCGGGA -3'*** → PrimeTime 5' 6-Cy5/TAO/3' IBRQ
(Integrated DNA Technologies)

*P. viticola vinifera**

Sonde : 5'- TAATGCCTCAACAATCAAACCG -3'*** → PrimeTime 5' TEX 615/3' IBRQ
(Integrated DNA Technologies)

* Le système pour *P. viticola vinifera* utilise les mêmes amorces que pour *P. viticola aestivalis*. Il n'est cependant pas nécessaire d'en commander plus.

**Les bases soulignées représentent des « locked nucleic acids (LNA) »

Développé avec le Master Mix QuantiFast Multiplex PCR +R Kit (Qiagen cat. no. 20475 - 4|6|7)

Développé dans l'appareil Agilent AriaMx

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 μM pour chacune des amorces ainsi que 5 μM pour la sonde.
3. Préparer le mix « 20x primer-probe mix » à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 μM pour chacune des amorces, et 0,25 μM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases. Pour *P. viticola viniferum*, ajouter seulement la sonde dans le mix, à raison de 0.25 μM .
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 μl . Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (μl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
20x primer-probe mix <i>P.v. riparia</i> (amorces sens et anti-sens (8 μM chacune) et sonde (5 μM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 μM Sonde: 0,25 μM	1,00
20x primer-probe mix <i>P.v. aestivalis</i> (amorces sens et anti-sens (8 μM chacune) et sonde (5 μM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 μM Sonde: 0,25 μM	1,00
20x primer-probe mix <i>P.v. vinifera</i> (amorces sens et anti-sens (8 μM chacune) et sonde (5 μM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 μM Sonde: 0,25 μM	1,00
Rnase-free water	-	9,00
Template DNA	Variable	3,00

Distribuer 17 μl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 μl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.

5. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
6. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
7. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Spécificité

Plasmopara halstedii
Plasmopara nivea
Plasmopara obducens
Plasmopara densa
Plasmopara euphrasiae
Plasmopara geranii-sylvatici
Plasmopara geranii
Plasmopara pusilla
Plasmopara wilsonii
Plasmopara praetermissa
Plasmopara chaerophylli
Paraperonospora tanacetii
Bremia lactucae
Peronospora destructor
Pseudoperonospora cubensis
Phytophthora infestans
Erysiphe necator
Botrytis cinerea
Elsinoë ampelina

Sensibilité

Ce système est capable de détecter jusqu'à 6 copies du gène ITS présent chez *P. viticola* *vinifera* (environ 1 spore), et jusqu'à 1 spore de *P. viticola riparia* et *P. viticola aestivalis*.

Annexe 1.18

Ce duplex comprend les systèmes développés pour *Botrytis cinerea* et *Botrytis pseudocinerea*.

Détection de *Botrytis cinerea* et de *Botrytis pseudocinerea* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce sens : Bc3igsFmCUT 5'- GCTGTAATTTCAATGTGCAGAATC-3'

Amorce anti-sens : Bc3igsR 5'- GGAGCAACAATTAATCGCATTTC-3'

Sonde : Bc3igsP 5'- TCACCTTGCAATGAGTGG -3' → PrimeTime 5' 6-FAM/ZEN/3' IBFQ (Integrated DNA Technologies)

Amorce forward : B.pseudo3F 5'- ATGGCTCTCCAAAGATCA-3'

Amorce Reverse : B.pseudo3R 5'-CCACGTTCTTTACGGTCT -3'

Sonde : B.pseudo3P 5'- GTTTGTGAAACTCCCGGCTA-3' → PrimeTime 5' Cy5 / TAO/ 3' IBRQ (Integrated DNA Technologies)

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil qPCR Agilent AriaMx (1 :200 dilution pour ROX)

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 µM pour chacune des amorces ainsi que 5 µM pour la sonde.
3. Préparer les mix « 20x primer-probe mix » pour chacun des systèmes à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 µM pour chacune des amorces, et 0,25 µM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 µl. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
QN ROX Reference Dye	1x	0,10
20x primer-probe mix <i>B. cinerea</i> (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
20x primer-probe mix <i>B. pseudocinerea</i> (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	9,90
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Spécificité

Botrytis cinerea

Plasmopara viticola riparia

Plasmopara viticola aestivalis

Elsinoë ampelina

Guignardia bidwellii

Alternaria dauci

Cercospora carotae
Sclerotinia sclerotiorum
Botrytis elliptica
Botrytis fabae
Botrytis narcissicola
Botrytis tulipae
Alternaria brassica
Cladosporium sp.
Colletotrichum gloeosporioides
Fusarium avenaceum
Fusarium Culmorum
Penicillium sp.
Pythium sp.
Sclerotinia sclerotiorum
Botrytis pseudocinerea
Erysiphe necator

Sensibilité

Ce système permet de détecter jusqu'à 2.7 fg d'ADN de *B. cinerea*, et jusqu'à 300 fg d'ADN de *B. pseudocinerea*.

Annexe 1.19

Ce duplex comprend les systèmes développés pour *Elsinoë ampelina* et *Guignardia bidwellii*.

Détection d'*Elsinoë ampelina* et de *Guignardia bidwellii* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce forward : EaF1 5'-GGACCGAACCAACTCTTT-3'

Amorce Reverse : EaR1 5'-TCTGGCATCGATGAAGAACG-3'

Sonde : EaP1 5'-TGCAGTCGGAGTACAACGTACAT-3' → PrimeTime 5' 6-FAM/ZEN/3'

IBFQ (Integrated DNA Technologies)

Amorce forward : GbF1 5'-GAAAAGCCGTCCGAAAGA-3'

Amorce Reverse : GbR1 5'-CAGGACTTCACGAAATAATCG-3'

Sonde : GbP1 5'-CCTTACCATGTTGCTTTGGCGG-3' → PrimeTime 5' Cy5 / TAO/ 3'

IBRQ (Integrated DNA Technologies)

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)

Développé dans l'appareil qPCR Agilent AriaMx (1 :200 dilution pour ROX)

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 µM pour chacune des amorces ainsi que 5 µM pour la sonde.
3. Préparer les mix « 20x primer-probe mix » pour chacun des systèmes à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 µM pour chacune des amorces, et 0,25 µM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 µl. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (µl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
QN ROX Reference Dye	1x	0,10
20x primer-probe mix <i>E. ampelina</i> (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
20x primer-probe mix <i>G. bidwellii</i> (amorces sens et anti-sens (8 µM chacune) et sonde (5 µM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 µM Sonde: 0,25 µM	1,00
Rnase-free water	-	9,90
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Spécificité

Botrytis cinerea

Botrytis pseudocinerea

Alternaria dauci
Cercospora carotae
Sclerotinia sclerotiorum

Sensibilité

Ce système peut détecter jusqu'à 1.5 fg d'ADN d'*Elsinöe ampelina* et jusqu'à 30 fg d'ADN de *Guignardia bidwellii* dans les conditions décrites dans ce protocole.

Annexe 1.20

Ce Triplex comprend les systèmes développés pour *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides* et *Colletotrichum viniferum*.

Détection de *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides* et *Colletotrichum viniferum* par qPCR

Matériel nécessaire :

Appareil qPCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

QuantiNova Multiplex PCR Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces et sonde diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

C. acutatum

Amorce sens : CacutF3 5'-GCCAACAAATAAACGCCACT -3'

Amorce anti-sens : CacutR3 5'-GACTTATTCGGTGACGTGCC -3'

Sonde : CacutP3 5'-TCTCGCCTGTCTGAGGAGAACGCA-3' → PrimeTime 5' 6-FAM/ZEN/3' IBFQ (Integrated DNA Technologies)

C. gloeosporioides

Amorce forward : CgloeF 5'-CCATCACCACAAATCACA -3'

Amorce Reverse : CgloeR 5'-GAGGTCGATGATTGACAG -3'

Sonde : CgloeP 5'-TTGCGACGCGTTTATCCGCCCT -3' → PrimeTime 5' Cy5/TAO/3' IBRQ (Integrated DNA Technologies)

C. viniferum

Amorce forward : CviniF 5'-CATTGAGACCAAGTACGCT -3'

Amorce Reverse : CviniR 5'-CGAGATGTAGATGACAGCG-3'

Sonde : CviniP 5'-TATCCCTCCAAACTCGCCATGA -3' → PrimeTime 5' HEX/ZEN/3' IBRQ (Integrated DNA Technologies)

Développé avec le Master Mix QuantiNova Multiplex PCR Kit (Qiagen cat. nos. 20845-2|4|6)
Développé dans l'appareil qPCR Agilent AriaMx (1 :200 dilution pour ROX)

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 8 μM pour chacune des amorces ainsi que 5 μM pour la sonde.
3. Préparer les mix « 20x primer-probe mix » pour chacun des systèmes à partir des solutions mères. Les concentrations finales doivent être de 0,4 μM pour chacune des amorces, et 0,25 μM pour la sonde. Diluer dans de l'eau stérile exempte de nucléases.
4. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 20 μl . Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.

Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (μl)
4x Multiplex PCR Master Mix	1x	5,00
QN ROX Reference Dye	1x	0,10
20x primer-probe mix <i>C. acutatum</i> (amorces sens et anti-sens (8 μM chacune) et sonde (5 μM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 μM Sonde: 0,25 μM	1,00
20x primer-probe mix <i>C. gloeosporioides</i> (amorces sens et anti-sens (8 μM chacune) et sonde (5 μM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 μM Sonde: 0,25 μM	1,00
20x primer-probe mix <i>C. viniferum</i> (amorces sens et anti-sens (8 μM chacune) et sonde (5 μM) dans du buffer TE)	Amorces: 0,4 μM Sonde: 0,25 μM	1,00
Rnase-free water	-	8,90
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 17 μl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 μl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil qPCR.

6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction qPCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil qPCR et programmer la réaction selon le programme suivant. L'acquisition des données de fluorescence se fait à la fin de chaque cycle d'amplification.

Programme qPCR

Hot Start	2 min, 95°C
Amplification	5 sec, 95°C ; 30 sec, 60°C (40 cycles)

Sensibilité

Multiplex : *C. acutatum* : 0.009 ng

Multiplex : *C. gloeosporioides* : 0.3 fg (testé avec un gBlocks)

Multiplex : *C. viniferum* : 0.03 fg (testé avec un gBlocks)

Spécificité

Colletotrichum dematium

Colletotrichum coccodes

Colletotrichum lineola

Colletotrichum godetiae

Colletotrichum nymphae

Colletotrichum brassicae

Colletotrichum graminicola

Colletotrichum orchidophilum

Colletotrichum fioriniae (positif avec système *acutatum*)

ANNEXE 2

Dans cette annexe, vous trouverez les différents gBlocks utilisés pour développer les essais qPCR.

- 2.1 gBlock *Plasmopara viticola vinifera*
- 2.2 gBlock *Colletotrichum gloeosporioides*
- 2.3 gBlock *Colletotrichum viniferum*

Annexe 2.1

gBlock pour *Plasmopara viticola vinifera*

TGCAATTTTCAGTCTTGAACGAGGAATTCCTAGTAAATGCAAGTCATCAGCTTGC GTTGATTACGTCCCTGCCCT
TTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAATGACTCGGTGAAAAATTGGGACCGTGAGTCCGCTTGCTTT
ATTGCGAGTGGAATTGATGGGAACCTTTTTTAAACCTCGCCATTTAGAGGAAGGTGAAGTCGTAACAAGGTTCCG
TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCAAATAGTTGGG
GATGACATAGGCAGCGACTACTGACTTTATTGTTGGCGGTTGCAGCTAATTGATTCCTATCATAGTGAAATAGC
ATGGAATTAATCCGAGCTAGTAGCTATTTTTTAAACCATTACTAAATACTGATTATACTGTGAGGACGAAAGT
CTTCGCTTTTACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACT
GCGATACGTAATGCGAATTGCAgGGATTGAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAG
TCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACAATAAACTTGGCATTTCATCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAAGT
AAAGCCAGATATGAAGTGTCTTGCCTTAATTTTAAATTGATTGCGAGTCCTTTTAAATGTACTAACTGTACTTC
TCTTTGCTCAAAAAGCATAGCGATTTTGGTTGTTAGACTGTGTGATTAGTAACAAAACCTTCTCCCGGTTTGATTG
TTGAGGCATTATGAAAGAGTATTTAATTTGCGGAAGCTGGCCTCGGCTAAGCTATACGCTTATATAGTATGCTT
TCTGCCATAACATTTACTGGTGAGTCGTAGTTACGACGTTGCTTTGTCTTTTAACCGGTTTTGCTGTTATAAAAG
ACTTTCATCTGTAGCCAATCGGCGATCAATTC

Annexe 2.2

gBlock pour *Colletotrichum gloeosporioides*

CCATCACCACAAATCACAACAACGCCTTGCGACGCGTTTATCCGCCCTGCCCTGAGCGTACCCCGCCGACATTT
TTACCCGACCTCTTTGCTCAACAAACGCGCGACGCCTGTCAATCATCGACCTCCTAGTCTGGAATGTTTTGCTGA
CTGCTGCTTTTCTGTCTACAGGTTACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTAAGTCTTCCTAAGCCAAATCCAACCGCC
TGATTGCGGGGCTAACCTCCTTGACAGGGTAACCAGATTGGTGCTGCCTTCTGGTACGTGACGAGACCGCCG
ACGACCCGGCAATATCATACTTGCGAGGACGGCAGATGTTGACGATGGAATAGGCAAAAACATTTCTGGCGAGC
ACGGCCTAGACAGCAATGGAGTGTATGTCATGCCCTTATCTGTCCACATTGGTGGTTGACCGCTAAACTCGAA
CAGCTACAACGGCACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTACTTCAACGAAGTTTGTTACCTTATAG
CCCCAAGAGTGCAAGATAAACATATTGACGAGTACTGACCTTCGCTGCTACCCAGGCTTCCGGCAACAAGTACG
TGCCCCGTGCCGTCTCGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCTTTTCGGCCAGCTC
TTCCGCCCC

Annexe 2.2

gBlock pour *Colletotrichum viniferum*

CGAGCACCCCGAGGTTCGAGATCGTTGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCC
CACCTATCCCTCCAACTCGCCATGACTTCACATCCATCACCACCACCACCGCTGTCATCTACATCTCGCCACCCG
CGTTTGGTAAACAAGAAGGCCGTCATGAATGGAGGCCAATTGAAACCATGGGTCGGGACGGCCGGACACATG
CTATCACTCATATCAGCCCCATCTGTCACATTTACTGACTCGCTCTTCACAGGCCTACATGCTCAAGTAC

ANNEXE 3

Dans cette annexe, vous trouverez le protocole suggéré pour l'extraction d'ADN à partir de lésions.

Extraction d'ADN

Le protocole suivant permet d'extraire l'ADN à partir de lésions sur bois vert, feuilles et baies. L'ADN extraite est de qualité et quantité suffisante pour permettre une amplification par PCR ou qPCR.

Protocole

- 1- Désinfecter en surface la ou les lésions;
 - a. Tremper la lésion durant 30 secondes dans de l'eau de javel 0.5%;
 - b. Tremper la lésion durant 30 secondes dans de l'éthanol 70%;
 - c. Tremper la lésion durant 30 secondes dans de l'eau distillée;
 - d. Répéter l'étape c 2 autres fois, pour un total de 3 trempages dans l'eau distillée;
- 2- À l'aide d'un scalpel, découper des morceaux de lésion en carrés d'environ 2mm x 2mm en tentant de couper au centre des lésions;
- 3- Procéder au protocole du kit commercial **PowerLyzer PowerSoil de Qiagen**. Aucune modification n'est nécessaire au protocole.
- 4- La lecture de la quantité et de la qualité au Nanodrop est facultative, car l'extraction d'ADN à partir d'une lésion ne génère pas assez d'ADN pour avoir une courbe adéquate sur cet appareil.
- 5- Procéder au PCR/qPCR à partir de l'ADN brute.

ANNEXE 4

Dans cette annexe, vous trouverez le protocole pour la détection de *Colletotrichum* sp. développé par Martinez-Culebras et al., 2003 et adapté pour ce projet.

Détection de *Colletotrichum* sp. par PCR

Matériel nécessaire :

Appareil PCR

Plaque (96 ou 384 puits)

Support cryogénique à plaque

Scelleur et scellant à plaque

Centrifugeuse avec rotor à plaque

Tubes 1,5 ml et/ou 4 ml

Phusion High-Fidelity DNA polymerase Kit

Buffer TE 1x pH 8,0

Eau stérile sans nucléase

Amorces diluées dans du buffer TE 1x pH 8.0

Amorce sens : col1 5'-AACCTTTGTGAACRTACCTA-3'

Amorce anti-sens : col2 5'-TTACTACGCAAAGGAGGCT-3'

Développé avec le Master Mix Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs cat. nos. M0530-S[L])

Développé dans l'appareil Agilent SureCycler 8800

Protocole

1. Mettre en marche les appareils requis pour le test de détection.
 2. Préparer les solutions mères d'amorces et de sonde à l'aide de buffer TE 1x pH 8,0. Nous suggérons une concentration de 10 μ M pour chacune des amorces.
 3. Préparer le master mix en suivant le tableau ci-dessous pour des réactions de 25 μ l.
 4. Multiplier selon le nombre d'échantillons. Nous suggérons de préparer le master mix pour le nombre d'échantillons + 10 % afin de conserver une marge de manœuvre lors du pipetage.
- Réaction (par échantillon)

Réactif	Concentration finale	Volume (μ l)
Phusion HF Master Mix	1x	12,50
Amorce sens (10 μ M)	0.5 μ M	1,25
Amorce anti-sens (10 μ M)	0.5 μ M	1,25
Rnase-free water	-	7,00
Template DNA	Variable	3,00

5. Distribuer 22 µl de master mix par puit et y ajouter ensuite 3 µl d'ADN par puit. Nous suggérons de déposer la plaque dans un support cryogénique afin de limiter l'exposition des réactifs à la chaleur avant le début de la réaction dans l'appareil PCR.
6. Sceller la plaque à l'aide d'un scellant et d'un scelleur à plaque. Nous déconseillons l'utilisation de scellant adhésif, car ceux-ci peuvent se décoller avec la chaleur lors de la réaction PCR.
7. Centrifuger la plaque 1 min à 3000 x g.
8. Déposer la plaque dans l'appareil PCR et programmer la réaction selon le programme suivant. Programme PCR

Hot Start	30 sec, 98°C
35 cycles	10 sec, 98°C; 30 sec, 65°C; 30 sec, 72°C
Élongation finale	10 min, 72°C

Visualiser les produits PCR par électrophorèse avec un gel d'agarose 1,2%, à 100v durant 35 minutes.

Les espèces suivantes ont été testées et parviennent à être amplifiées dans les conditions décrites plus haut :

Colletotrichum coccodes
Colletotrichum lineola
Colletotrichum godetiae
Colletotrichum brassicae
Colletotrichum acutatum
Colletotrichum orchidophilum
Colletotrichum fioriniae

Les espèces suivantes ont été testées et ne parviennent pas à être amplifiées dans les conditions décrites plus haut :

Colletotrichum dematium
Colletotrichum nymphaeae
Colletotrichum graminicola

ANNEXE 5

Dans cette annexe, vous trouverez un protocole pour la détection de *Botrytis cinerea* utilisant la méthode d'amplification isothermique par boucle développé par Tomlinson *et al.*, 2010 et adapté pour ce projet

LAMP pour la détection de *Botrytis cinerea*

Amorces : F3: TCGGAGTGTCTAGGAATGC

B3: TGAGATGGCCAACTCTCAGA

FIP: GCCTGCTCACCGGTAGTAGTGTGTGAGCCCTTGGTCTAAAGC

BIP: GCAGAATCTGTCCCCGGTGAGCGGGAGCAACAATTAATCGC

F-Loop: TGGGGTTAACTAGTCACCTATACG

B-Loop: AGGTCACCTTGCAATGAGTGGA

Extraction d'ADN : L'ADN extrait avec le protocole « lossless DNA extraction » développé par Mathieu Tremblay fonctionne très bien avec ce système. Le kit commercial PowerLyser PowerSoil de Qiagen aussi.

Polymérase : Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase avec le kit WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (New England BioLabs M1800)

MasterMix:

Réactif	Concentration initiale	Volume	Concentration finale
WarmStart Colorimetric LAMP Master Mix	2X	12.5 µl	1X
F3	2 µM	2.5 µl	0.2 µM
B3	2 µM		0.2 µM
FIP	20 µM		2 µM
BIP	20 µM		2 µM
F-Loop	10 µM		1 µM
B-Loop	10 µM		1 µM
Eau	-	7 µl	-
ADN	-	3 µl	-

Réaction : 30 minutes à 65 °C

Spécificité :

Botrytis ficariarum

Botrytis aclada

Botrytis allii

Botrytis elliptica

Botrytis porri

Botrytis pseudocinerea

Botrytis ranunculi

Botrytis squamosa

Elsinoë ampelina

Sclerotinia cepivorum

Sclerotinia minor

Cercosporae carotae

Alternaria dauci

Alternaria mali

Phomopsis viticola

Plasmopara viticola

ANNEXE 6

Dans cette annexe, vous trouverez le protocole pour le séquençage d'amplicons ITS pour la détection par séquençage Nanopore.

Extraction d'ADN

Dans le cadre de ce projet, tous les ADN utilisés ont été extraits avec le kit commercial PowerLyzer PowerSoil de Qiagen, sans apporter de modification au protocole fourni. Toutefois, pour le séquençage d'amplicons par Nanopore, la méthode d'extraction d'ADN importe peu, tant que l'ADN est d'assez bonne qualité et quantité pour être amplifiée par PCR conventionnelle. Une bonne méthode pour évaluer la qualité ainsi que la quantité de l'ADN est le dosage. Il est recommandé de doser l'ADN au Nanodrop, qui permet d'obtenir la concentration d'ADN, ainsi que les mesures de qualité, les ratios 260/280 et 260/230, qui devraient se situer autour de 1.8 et entre 2 et 2.2 respectivement, et au dosage au Qubit, qui permet d'obtenir la concentration d'ADN de l'extrait et des solutions d'amplicons avec une grande précision. Nous suggérons une concentration d'au moins 1 ng/μl afin de permettre une bonne amplification PCR. Cette méthode nous a permis d'effectuer les réactions PCR requises pour le séquençage.

Amplification PCR

Pour l'identification des agents pathogènes, nous suggérons d'amplifier le gène *ITS* et *tefl*. Pour le gène *ITS*, la réaction de PCR se fait dans un volume réactionnel de 25μl, avec les amorces ITS1 (GCCGTAGGTGAACCTGCGG, 0.5uM) et ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC, 0.5uM), le mélange réactionnel Phusion High-Fidelity (NEB –M0531L) et le programme suivant :

- Dénaturation initiale : 98°C, 2 minutes
- 35 cycles
 - 98°C, 10 secondes
 - 55°C, 15 secondes
 - 72°C, 30 secondes
- Extension finale : 72°C, 10 minutes

Pour le gène *tefl*, la réaction de PCR se fait dans un volume réactionnel de 25μl avec les amorces A133F (GAYTTCATCAAGAACATGAT, 0.5μM) et A133R (GACGTTGAADCCRACRTTGTC, 0.5μM), le mélange réactionnel Phusion High-Fidelity (NEB M0531L) et le programme suivant :

- Dénaturation initiale : 98°C, 2 minutes
- 35 cycles
 - 98°C, 10 secondes
 - Touchdown 65°C à 57°C, 15 secondes
 - 72°C, 30 secondes
- Extension finale : 72°C, 10 minutes

Nous suggérons également l'ajout de BSA à une concentration finale de 0.2% dans la préparation du master mix afin de réduire l'effet de potentiels inhibiteurs.

Pour les gènes de résistance aux fongicides chez *Botrytis cinerea*, nous suggérons d'amplifier les gènes *sdhB*, *cytb* et *erg27*. Pour le gène *sdhB*, nous utilisons les amorces IpBcBeg (CCACTCCTCCATAATGGCTGCTCTCCGC) et IpBcEnd2¹ (CTCATCAAGCCCCCTCATTGATATC) et le programme suivant :

- Dénaturation initiale : 98°C, 30 secondes
- 30 cycles
 - 98°C, 10 secondes
 - 71°C, 30 secondes
 - 72°C, 30 secondes
- Extension finale : 72°C, 10 minutes

Pour le gène *cytb*, nous utilisons les amorces Qo13ext (GGTATAACCCGACGGGGTTATAGAATAG) et Qo14ext² (AACCATCTCCATCCACCATACCTACAAA) et le programme suivant :

- Dénaturation initiale : 98°C, 30 secondes
- 30 cycles
 - 98°C, 10 secondes
 - 69°C, 30 secondes
 - 72°C, 30 secondes
- Extension finale : 72°C, 10 minutes

Pour le gène *erg27*, nous utilisons les amorces erg271F (CTTGTC AATGGAACTGTTGG) et erg271R2 (TAACCTTCAA AAGTCCCTCC) et le programme suivant :

- Dénaturation initiale : 98°C, 30 secondes
- 30 cycles
 - 98°C, 10 secondes
 - 63°C, 30 secondes
 - 72°C, 30 secondes
- Extension finale : 72°C, 10 minutes

1) Leroux et al., 2010

2) Fernandez-Ortuno et al., 2012

Préparation des librairies

Pour la préparation des librairies, nous suggérons l'utilisation des kits Native Barcoding Kit 96 V14 (SQK-NBD114.96) et Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24). Ces kits permettent principalement d'optimiser les coûts en augmentant le nombre d'échantillons pouvant être séquencés par essai (jusqu'à 96 échantillons par réaction de séquençage). Les

versions V14 de ces kits sont compatibles avec les cellules R10.4.1, qui permettent également d'augmenter la qualité des séquences et réduisent le taux d'erreur. Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé la version NBA_9170_v114_revL_15Sep2022 du protocole pour le kit Native Barcoding Kit 96 V14 avec les modifications suivantes :

- Tous les amplicons ont été ajustés à 1 ng/μl afin de permettre une meilleure uniformité à travers les multiples échantillons séquencés;
- À l'étape « End-prep », remplacer le DCS (Diluted DNA Control Sample) par de l'eau;
- À l'étape « End-prep », incuber à 20°C et 65°C pour 10 minutes chacun au lieu de 5 minutes;
- À l'étape « Adapter ligation and clean-up », utiliser le Short Fragment Buffer (SFB) pour tous les amplicons mentionnés à l'étape précédente;
- Ajuster la librairie finale à 20 fmol maximum;
- À l'étape « Priming and loading the SpotON flow cell », nous avons utilisé de la BSA à une concentration de 20 mg/ml au lieu de 50 mg/ml simplement parce que c'est ce que nous avons au laboratoire, et cela fonctionne très bien.

Séquençage par Nanopore

Pour le séquençage, nous suggérons d'utiliser les Flow Cells R10.4.1, comme mentionné dans l'étape précédente, avec un séquenceur MinION Mk1C. Ce dernier permet une meilleure gestion de la température réactionnelle de la cellule par rapport au MinION Mk1B. Nous suggérons un temps de séquençage d'un maximum de 20h. Au-delà de cette durée, l'ajout de nouvelles lectures n'apporte rien de plus, et suite à un lavage de la cellule avec le kit cellule Wash Kit (EXP-WSH004), cela permet d'effectuer un second essai sur la même Flow Cell. Pour ce projet, les paramètres par défaut de MinKnow ont été conservés lors des essais.

Analyses

À la fin de l'essai, les données de séquençage doivent être transférées sur un poste de travail Linux afin de procéder aux analyses. Les analyses se font en plusieurs étapes, et requièrent des commandes Linux et des scripts sur RStudio. Comme ces lignes de commandes et ces scripts sont plus facilement transférables sous forme de fichiers et avec des explications obtenues dans le cadre d'une formation, ceux-ci seront remis aux membres du LEDP qui seront présents lors d'un atelier de transfert. Ces fichiers seront par la suite disponibles aux membres du LEDP sous une plateforme web tel que GitHub.

ANNEXE 7

Dans cette annexe, vous trouverez la liste des inhibiteurs potentiels lors d'extraction d'ADN à partir d'échantillons de vigne.

Inhibiteurs potentiels dans la vigne

Dans les baies

- Phénols¹
- Polysaccharides¹

Dans la plante

- Pectine¹
- Polyphénols¹
- Polysaccharides¹
- Xylan¹
- Sulfate de dextran²
- Pectine²
- Acide tannique²
- Acide humique²

(1) C. Schrader, A. Schielke, L. Ellerbroek, R. Johne, PCR inhibitors – occurrence, properties and removal, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 113, Issue 5, 1 November 2012, Pages 1014–1026, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>

(2) Rački, N., Dreo, T., Gutierrez-Aguirre, I. et al. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods* 10, 42 (2014). <https://doi.org/10.1186/s13007-014-0042-6>

ANNEXE 8

Dans cette annexe, vous trouverez une revue de littérature sur les différentes méthodes d'extraction d'ADN possibles pour les champignons.

Méthodes d'extraction d'ADN

Méthode au phénol et chloroforme

- T. H. Al-Samarrai, J. Schmid, A simple method for extraction of fungal genomic DNA, Letters in Applied Microbiology, Volume 30, Issue 1, 1 January 2000, Pages 53–56, <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00664.x>
- Weiland, J. J. (1997) "Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia.," Fungal Genetics Reports: Vol. 44, Article 22. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1290>

L'extraction d'ADN au phénol et chloroforme requiert beaucoup de produits chimiques et demande plusieurs étapes de pipetage et de centrifugation.

Méthode au CTAB (bromure de cétyltriméthylammonium)

- Y.J. Zhang, S. Zhang, X.Z. Liu, H.A. Wen, M. Wang, A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains, Letters in Applied Microbiology, Volume 51, Issue 1, 1 July 2010, Pages 114–118, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02867.x>
- J.-A.H. van Burik, R.W. Schreckhise, T.C. White, R.A. Bowden, D. Myerson, Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi, Medical Mycology, Volume 36, Issue 5, January 1998, Pages 299–303, <https://doi.org/10.1080/02681219880000471>

L'extraction d'ADN au CTAB ajoute une étape de plus à la purification au phénol et chloroforme. Cette méthode requiert donc plus de produits chimiques et plus d'étapes de pipetage que la méthode au phénol et chloroforme.

Méthode utilisant une lyse thermique

- Y.J. Zhang, S. Zhang, X.Z. Liu, H.A. Wen, M. Wang, A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains, Letters in Applied Microbiology, Volume 51, Issue 1, 1 July 2010, Pages 114–118, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02867.x>
- S. Manian, S. Sreenivasaprasad, P.R. Mills, DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi, Letters in Applied Microbiology, Volume 33, Issue 4, 17 October 2001, Pages 307–310, <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.01001.x>

L'extraction d'ADN avec une lyse thermique reste très simple. Une solution de lyse est ajoutée au matériel à extraire, puis l'échantillon est soumis à une forte chaleur, ou à des cycles de froid et chaud. L'échantillon doit être moulu avant l'extraction.

Méthode utilisant du SDS (dodécylsulfate de sodium)

- J. Feng, R. Hwang, K. F. Chang, S. F. Hwang, S. E. Strelkov, B. D. Gossen & Q. Zhou (2010) An inexpensive method for extraction of genomic DNA from fungal mycelia, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32:3, 396-401, DOI: 10.1080/07060661.2010.508620
- Yalong Yang, Krista Zuzak & Jie Feng (2016) An improved simple method for DNA extraction from fungal mycelia, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38:4, 476-482, DOI: 10.1080/07060661.2016.1243585

L'extraction d'ADN au SDS requiert beaucoup de produits chimiques et demande plusieurs étapes de pipetage et de centrifugation. Moins complexe que la méthode au phénol et chloroforme.

Méthode au Chelex

- Ceren Turan, Irene Maja Nanni, Agostino Brunelli, Marina Collina, New rapid DNA extraction method with Chelex from *Venturia inaequalis* spores, *Journal of Microbiological Methods*, Volume 115, 2015, Pages 139-143, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.06.005>
- Ferencova, Z., Rico, V., & Hawksworth, D. (2017). Extraction of DNA from lichen-forming and lichenicolous fungi: A low-cost fast protocol using Chelex. *The Lichenologist*, 49(5), 521-525. doi:10.1017/S0024282917000329

L'extraction d'ADN au chelex est très simple. Une solution de chelex est ajouté au matériel à extraire, puis l'échantillon est soumis à une forte chaleur.

Méthode utilisant des kits commerciaux

- David N. Fredricks, A Caitlin Smith, Amalia Meier, Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR, 2005, *Journal of Clinical Microbiology*, Pages 5122-5128, Volume 43, Number 10, doi:10.1128/JCM.43.10.5122-5128.2005
- W. R. Rittenour , J. H. Park , J. M. Cox-Ganser , D. H. Beezhold and B. J. Green , J. Environ. Monit., 2012, 14 , 766 —774
- Schiebelhut, L.M., Abboud, S.S., Gómez Daglio, L.E., Swift, H.F. and Dawson, M.N. (2017), A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses. *Mol Ecol Resour*, 17: 721-729. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12620>

plusieurs kits commerciaux sont disponibles. Certains sont plus universels, alors que d'autres sont conçus spécialement pour un substrat en particulier. Beaucoup de variation au niveau de la quantité d'ADN extraits et de la qualité de cet ADN entre les kits.

Extraction à partir de feuilles

- Piccolo, S. L., Alfonzo, A., Conigliaro, G., Moschetti, G., Burruano, S., & Barone, A. (2012). A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis. *African Journal of Biotechnology*, 11(45), 10305.
- Willits, D. A., & Sherwood, J. E. (1999). Polymerase chain reaction detection of *Ustilago hordei* in leaves of susceptible and resistant barley varieties. *Phytopathology*, 89(3), 212-217.

Les feuilles sont moulues avant l'extraction. Une extraction au CTAB semble fonctionner.

Extraction à partir de baies

- G. Mulè, A. Susca, A. Logrieco, G. Stea, A. Visconti, Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 111, Supplement 1, 2006, S28-S34, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.010>.
- R. Laforgue, L. Guérin, J.J. Pernelle, C. Monnet, J. Dupont, M. Bouix, Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 107, Issue 4, 1 October 2009, Pages 1208–1218, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04309.x>

Il est possible de nettoyer les baies, puis d'inoculer un pétri avec l'eau de nettoyage pour procéder à l'extraction d'ADN sur le mycélium frais, mais il est aussi possible d'extraire l'ADN à partir de baies congelées et incubées dans une solution d'extraction. Une extraction au CTAB semble fonctionner.

Extraction à partir de bois

- Schmidt, O., Gaiser, O., & Dujesiefken, D. (2012). Molecular identification of decay fungi in the wood of urban trees. *European Journal of Forest Research*, 131, 885-891.
- Pouzoulet, J., Mailhac, N., Couderc, C., Besson, X., Daydé, J., Lummerzheim, M., & Jacques, A. (2013). A method to detect and quantify *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 10163-10175.

Il est possible d'extraire l'ADN à partir de bois moulu, ou à partir de petits copeaux découpés aux ciseaux. Une extraction au CTAB semble fonctionner.

Review

- Nasir Ali, Rita de Cássia Pontello Rampazzo, Alexandre Dias Tavares Costa, Marco Aurelio Krieger, "Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics", *BioMed Research International*, vol. 2017, Article ID 9306564, 13 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>

ANNEXE 9

Dans cette annexe, vous trouverez la liste des isolats envoyée au laboratoire d'AAC par le LEDP. La totalité représente des cultures pures. Tous les échantillons terrain transmis à AAC n'étaient pas en bonnes conditions lors de la réception. Une des causes observées est l'humidité abondante dans les sacs de plastique, qui accélère la pourriture des échantillons durant le transport, ce qui rendait le champignon visé impossible à extraire de l'échantillon.

Liste des échantillons transmis avec succès par le laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection

Phomopsis viticola

- 58399, 58400, 58404, 58405, 58425, 58404, 58426, 58406, 58399, 59203

Elsinoe ampelina

- 58423, 58424

Pseudopezicula tracheiphila

- 59847, 60789, 60802, 60803

Pseudopezicula tetraspora

- 60315, 60316

Plasmopara viticola

- 59202

Phylostica

- 60578FR

Colletotrichum (nymphaeae, coccodes, graminicola, dematium, orchidophilum, fioriniae acutatum, godetiae, lineola)

- 46354, 41332, 42583, 32103, 56785, 37551, D41540, 64544, 67316, 67371, 67844, 68364, 67048, 65175, 65644, 64665, 65921, 66733, 66109, 67868, 68200, 68204, 68365

Botrytis (euroamericana, cinerea, deweyae/fabiopsis)

- 65516, 66340, 67691

Coniella vitis

- 64517