

Développement d'outils moléculaires quantitatifs et de séquençage de troisième génération pour les formes spéciales de *Fusarium oxysporum* en production maraîchère, les bactéries de l'oignon et les complexes de *Phytophthora* spp. dans les cultures de sapin de Noël.

19-011-2.2-C-PHYTO

AVRIL 2019 – MARS 2024

RAPPORT FINAL

Réalisé par :

Andréanne Sauvageau, Phytodata
Anne Piuze-Paquet, Phytodata
Philippe Tanguay, CFL
Guillaume Bilodeau, ACIA
Guillaume Charron, Phytodata
Hervé van der Heyden (ancien directeur scientifique Phytodata)

Collaborateurs

Antoine Dionne, LEDP
Marc-Olivier Duceppe, ACIA

Mars 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.

Développement d'outils moléculaires quantitatifs et de séquençage de troisième génération pour les complexes pathogènes : *Phytophthora*, *Fusarium* et bactérioses de l'oignon.

19-011-2.2-C-PHYTO

RÉSUMÉ DU PROJET

Les maladies des plantes causées par différents organismes phytopathogènes sont responsables de pertes économiques importantes pour une multitude d'exploitations au Québec et ailleurs. Le développement de stratégies de gestion intégrée des maladies au champ, en serre ou de programmes de la surveillance des ennemis de culture à nos frontières, nécessite des outils de diagnostic rapides et précis, permettant d'obtenir une information quantitative. Depuis une dizaine d'années, les approches moléculaires, principalement les méthodes de PCR quantitatives en temps réel (qPCR), ont permis le développement de méthodes de détection spécifiques et précises, mais relativement peu adaptées lorsqu'il s'agit de diagnostiquer des problèmes phytosanitaires complexes. Aujourd'hui, l'intégration des outils de séquençage de 3^e génération pour des fins de diagnostic pourrait devenir une méthode de référence abordable et accessible pour la plupart des laboratoires. Ce projet visait à développer une gamme d'outils moléculaires innovants permettant d'améliorer les capacités provinciales en matière de diagnostic et de surveillance phytosanitaire. Trois complexes pathogènes étaient visés dans le cadre de ce projet : le complexe Phytophthoréen dans la culture de sapins de Noël, le complexe de bactérioses de l'oignon, ainsi que les formes spéciales de *Fusarium oxysporum* dans les cultures maraichères. Au terme de ce projet, un test de PCR quantitatif (taqman) spécifique à *Phytophthora abietivora* a été conçu et un outil de séquençage (IonTorrent) permettant la détection de plusieurs espèces du complexe a également été développé. De plus, un outil de séquençage (MinIon) a été développé pour le complexe de bactérioses dans l'oignon. Enfin, plusieurs outils moléculaires de types PCR et PCR quantitatif ont été adaptés afin de mieux comprendre et d'identifier les *Fusarium oxysporum formae speciales lycopersici, cepae, spinaciae, lactucae, radicis-cucumerinum, fragaria* et *apii*, responsables de la fusariose précisément dans la tomate, l'oignon, l'épinard, la laitue, le concombre, la fraise et le céleri. En plus de ces marqueurs moléculaires, les nouvelles connaissances acquises sur la génétique des *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* pourront être utilisées ultérieurement dans le développement d'outils de 3^e génération, tel que le MinIon par exemple, afin d'obtenir un diagnostic rapide de la forme spéciale en question.

OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE

A. Les complexes phytophthoraéens dans le sapin de Noël

Échantillonnage des plantations.

Une méthodologie d'échantillonnage a été développée dans le but d'obtenir des isolats de *Phytophthora* retrouvés dans les plantations de sapins de Noël. Les plantations sélectionnées se trouvent dans les régions de Chaudière-Appalaches et de l'Estrie (Tableau 1), qui regroupent près de 65% des exploitations et plus de 88% de la surface exploitée. En 2019, 20 exploitations ont été échantillonnées (10 dans chaque région). Dans chaque plantation, 12 échantillons de sols ont été prélevés de 3 types d'arbres (4 échantillons par type) : des arbres en apparence malade, des arbres d'apparence saine et des arbres d'une forêt naturelle à proximité de la plantation (Figure 1A). Chaque échantillon est formé de 3 demi-carottes de terre récoltée 17 cm sous l'horizon organique du sol, placé dans des sacs de plastique, et gardé au frais jusqu'au laboratoire (Figure 1B, C).

Tableau 1: Liste des producteurs ciblés pour l'échantillonnage.

Numéro du site	Année (s)	Location	Coordonnées GPS	Espèces cultivées
1	2019 et 2020	Chaudière-Appalaches	46.714471, -71.212684	balsam
2	2019 et 2020	Chaudière-Appalaches	46.780222, -71.120361	balsam
3	2019	Chaudière-Appalaches	46.171528, -70.848972	balsam
4	2019	Chaudière-Appalaches	46.068222, -70.929111	balsam "cook"
5	2019	Chaudière-Appalaches	46.056972, -71.124556	balsam "cook"
6	2019	Chaudière-Appalaches	45.991139, -71.485611	balsam
7	2019	Chaudière-Appalaches	45.954488, -70.858245	balsam
8	2019	Chaudière-Appalaches	45.954492, -70.858245	balsam "cook"
9	2019	Chaudière-Appalaches	45.938861, -70.856917	balsam
10	2019	Chaudière-Appalaches	45.938861, -70.856917	balsam
11	2019 et 2021	Estrie	45.172889, -71.487605	balsam
12	2019 et 2021	Estrie	45.230506, -71.937717 45.231361, -71.927792	Fraser (2019) balsam (2021)
13	2019 et 2021	Estrie	45.114804, -71.998998	balsam
14	2019	Estrie	45.036552, -72.021969	Fraser

15	2019 et 2021	Estrie	45.063416, -71.875822	balsam
16	2019 et 2021	Estrie	45.230306, -71.764462	Fraser
17	2019 et 2021	Estrie	45.355868, -71.829743	balsam
18	2019 et 2021	Estrie	45.373306, -71.697270	balsam
19	2019	Estrie	45.674133, -71.147980	balsam
20	2019 et 2021	Estrie	45.902924, -71.023241	Fraser
21	2020	Chaudière-Appalaches	45.9550, -70.82834	balsam
22	2020	Chaudière-Appalaches	46.02861, -70.87861	Fraser
23	2020	Chaudière-Appalaches	46.01888, -70.87527	Fraser
24	2020	Chaudière-Appalaches	45.96583, -70.79666	balsam
25	2020	Chaudière-Appalaches	45.87638, -70.8572	balsam
26	2020	Chaudière-Appalaches	45.92416, -70.84666	balsam "cook"
27	2020	Chaudière-Appalaches	45.93305, -70.75375	balsam
28	2020	Chaudière-Appalaches	46.05916, -70.80722	balsam
29	2021	Estrie	45.077082, -72.043458	Fraser
30	2021	Estrie	45.761968, -70.993923	Fraser

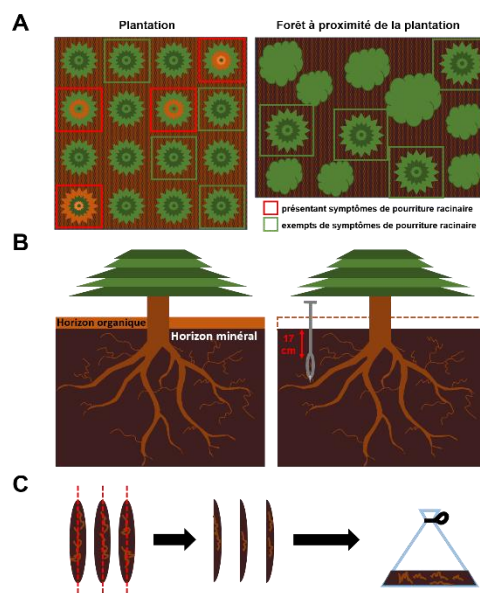


Figure 1: Représentation de la méthodologie d'échantillonnage. A. Douze arbres par plantation sont échantillonnés. B. L'horizon organique est retiré autour du sapin choisi, trois carottes d'horizon minéral sont prélevées à une profondeur de 17 cm. C. Les trois carottes sont divisées sur l'axe vertical et les trois tiers sont regroupés dans un sac d'échantillonnage.

Les 240 échantillons de sol ont par la suite été traités suivant les mêmes étapes. Premièrement, chaque sac de sols a été homogénéisé avec un tamis stérile. À partir de ce sol, 250 cm³ ont été réservés pour le piégeage sur feuille de rhododendron (description section suivante), 250 mg ont été utilisés pour une extraction d'ADN total et 50 cm³ ont été gardés comme échantillons de réserve (Figure 2A). Pour les échantillons de sol provenant d'arbres malades (80), des racines et radicelles ont été prélevées des échantillons de terre, et mises de côté pour réaliser des isollements de *Phytophthora*. Lors du deuxième échantillonnage en 2020, une racine principale avec ses radicelles a été ajoutée aux sacs de sols pour faciliter le prélèvement de racines. En 2020, la même méthodologie était prévue, mais seuls les échantillons de Chaudière-Appalaches ont pu être récoltés avant l'interruption des activités de terrain en raison de la crise sanitaire liée à la COVID-19.

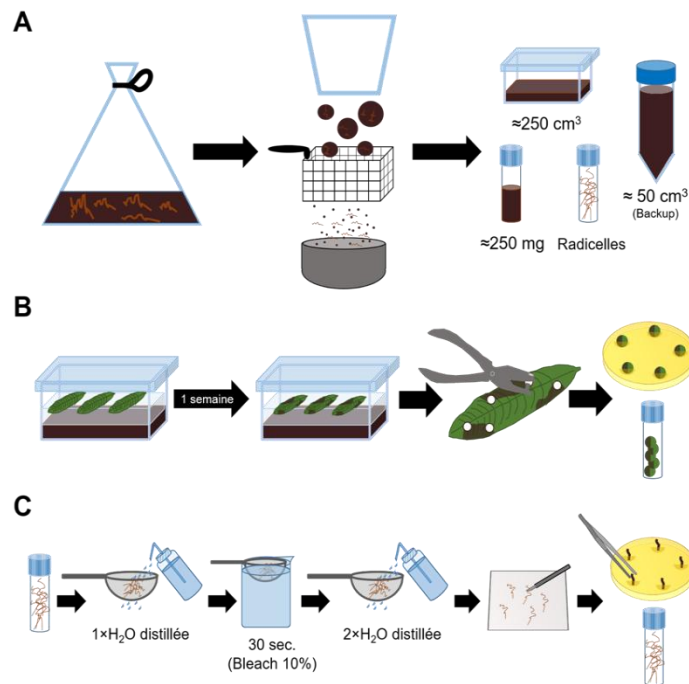


Figure 2: Traitement des échantillons de terre et de radicelles. A. Suivant la réception des échantillons, ceux-ci sont homogénéisés et séparés en différents sous-échantillons. B. Le piégeage des oomycètes se fait en ajoutant de l'eau aux 250 cm³. Après 1 semaine, les feuilles nécrosées sont lavées et des disques foliaires sont prélevés pour inoculer un milieu nutritif et pour des extractions d'ADN. C. Les radicelles sont lavées et leur surface est stérilisée. Elles sont ensuite coupées en morceaux et déposées sur un milieu nutritif, le reste est utilisé dans des extractions d'ADN.

Piégeage d'Oomycètes sur feuilles de Rhododendron.

Les oomycètes ont la particularité de produire des spores motiles (zoospores) capables de se déplacer en milieu aquatique. Ces spores sont aussi impliquées dans l'infection des plantes et peuvent s'attaquer

à diverses structures végétales comme des racines ou des feuilles. La première stratégie utilisée afin de récolter des isolats de *Phytophthora* dans les échantillons de sols des plantations de sapins de Noël est basée sur ces particularités. Un volume de 250 cm³ de terre a donc été recouvert de 500 mL d'eau distillée (Figure 2B), permettant aux spores motiles de se déplacer librement dans le milieu. Cinq feuilles de rhododendron, une plante hôte universelle des *Phytophthora*, ont été déposées à la surface de l'eau afin d'attirer les zoospores et de les « piéger » à l'intérieur des tissus végétaux. Après 3 à 7 jours d'incubation à la noirceur à une température de 20°C, on peut observer l'émergence de nécroses sur les feuilles (Figure 2B). Ces nécroses sont signe de la mort des tissus à la suite de la multiplication de microorganismes. Les feuilles sont alors retirées de la surface de l'eau et nettoyées à l'eau du robinet et séchées à l'air ambiant.

À l'aide de perforateurs à papier stériles, dix disques foliaires contenant des tissus nécrosés sont prélevés parmi les cinq feuilles (Figure 2B). Cinq de ces disques sont gardés pour des extractions d'ADN total et les cinq autres sont insérés dans un milieu gélose nutritif semi-sélectif contenant un cocktail d'antibiotiques qui limite la croissance de la plupart des microorganismes qui ne sont pas des oomycètes (Figure 2B). Ces milieux sont incubés à la noirceur pour environ une semaine et observés régulièrement pour détecter l'apparition de croissance mycélienne. Le mycélium des oomycètes croît de manière radiale et forme une zone de croissance blanchâtre autour des disques foliaires, à la surface ou dans le milieu gélosé. Afin d'obtenir des cultures pures, des hyphes sont prélevés en périphérie de la zone de croissance, transférés vers un nouveau milieu stérile, et incubés 2 à 3 jours à 20°C. Ces cultures pures peuvent ensuite être utilisées pour des extractions d'ADN ou encore peuvent être conservées à 12°C pour quelques mois. Pour la conservation à long terme des cultures de *Phytophthora*, des pastilles de milieu contenant du mycélium sont gardées dans de l'eau stérile à température pièce. Des résultats publiés ont montré que pour plusieurs espèces de *Phytophthora*, cette méthode permettait de conserver des cultures viables pendant plusieurs années. Au besoin, ces pastilles peuvent être déposées sur un milieu de culture afin de générer du mycélium frais.

Isolement d'oomycètes à partir de radicelles.

Comme deuxième stratégie utilisée pour obtenir des isolats de *Phytophthora* de nos échantillons, nous avons tenté des isollements directement à partir des radicelles (Figure 2C). Pour ce faire, les radicelles prélevées de nos échantillons de sols ont d'abord été nettoyées avec de l'eau distillée afin d'enlever le plus de terre possible à leur surface. Ensuite, les radicelles ont subi une stérilisation de surface en les plongeant dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.5% pendant 30 secondes. Après des rinçages à l'eau distillée, les racines ont été séchées à l'air ambiant, et cinq sections de racine par échantillon de sol ont été piquées dans un milieu gélose semi-sélectif pour les *Phytophthora*. Le reste du protocole d'isolement est identique à celui utilisé pour l'isolement d'oomycètes à partir de disques foliaires.

Extractions d'ADN.

Différents kits ont été utilisés pour extraire l'ADN total des échantillons de terre, des disques foliaires et des radicelles. Deux kits différents ont été utilisés, soit le kit Powersoil (QIAGEN) pour les échantillons de radicelles et de sols ainsi que le kit DNA plant mini (QIAGEN) pour les échantillons de disques foliaires. Tous les ADN obtenus ont été envoyés au Dr Guillaume Bilodeau à l'ACIA pour la préparation de bibliothèques de séquençage. Ces extraits d'ADN environnementaux sont complémentaires aux échantillons d'ADN extraits de cultures pures et pourront identifier des espèces de *Phytophthora* qui pourraient avoir échappé à la mise en culture.

Les ADNs de toutes les cultures pures isolées des disques foliaires et des radicelles ont été extraits avec un protocole d'extraction au phénol:chloroforme optimisé pour les champignons filamenteux (<https://www.protocols.io/view/high-quality-dna-extraction-from-fungi-small-scale-exmbfk6>). Ces ADN ont été utilisés pour l'identification des différents organismes récoltés

Identification par PCR.

Afin d'identifier les oomycètes isolés et cultivés, une approche d'identification moléculaire par amplification PCR et séquençage SANGER a été utilisée. La PCR permet d'obtenir des millions de copies d'une région génétique précise située entre deux points précis délimités par des amorces. Cet ADN amplifié peut ensuite être séquencé et utilisé comme base pour l'identification par comparaison avec des séquences présentes dans des bases de données internationales. L'ITS (Internal Transcribed Spacer) située entre les régions 18S et 28S a tout d'abord été amplifiée avec des amorces spécifiques à la région englobant l'ITS1, la région 5.8S et l'ITS 2. Ce locus est couramment utilisé en tant que code-barres moléculaire pour l'identification des champignons, ce qui fait que les séquences de cette région sont facilement disponibles dans les bases de données d'ADN. Avec les amorces utilisées, la région ITS1-5.8S-ITS2 des *Phytophthora* s'étend sur environ 850 paires de bases (pb). Un premier criblage, basé sur la taille de la région amplifiée, a permis de réduire le nombre d'échantillons à être séquencés.

Les chromatogrammes ont été analysés à l'aide du logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) afin de faire une correction manuelle des séquences. Ces corrections sont parfois nécessaires afin d'enlever les codes d'ambiguïté insérés dans les séquences lorsque le signal contient du bruit de fond. Les séquences ont ensuite été comparées à la base de données Nucleotide collection (nr/nt) du NCBI par le biais de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) qui recherche des régions de similarité entre les séquences soumises et celles disponibles dans la base de données. Pour les isolats dont les ITS ont permis une assignation au genre *Phytophthora*, deux autres régions (cytochrome oxydase et Bêta-Tubuline) ont été amplifiées et séquencées. Ces séquences ont ensuite été concaténées afin de réaliser une analyse phylogénétique et de construire un arbre phylogénétique. Cet arbre permet d'obtenir une représentation graphique des relations évolutives entre nos souches et une centaine d'espèces connues du genre *Phytophthora*.

Test de pathogénicité.

Un test de pathogénicité a été réalisé sur trois isolats de *Phytophthora abietivora* afin de déterminer si cette espèce avait un rôle à jouer dans la pourriture racinaire observée dans les plantations de sapins de Noël (Figure 3). En résumé, les isolats 062_E, 097_A et 170_B ont été inoculés sur des milieux de culture V8-PARPNH et ont été incubés à 20°C pendant 7 jours. Après incubation, 10 cubes d'agar ont été prélevés au front de croissance. Pour chaque isolat, les cubes ont été inoculés dans un mélange stérile de vermiculite, d'avoine épointée (steel cut oats) et de jus de légume (V8) clarifié dans un ratio volumique de 1:1:1 (Figure 4A). Un mélange contrôle négatif a aussi été préparé en ajoutant 10 cubes d'agar stérile. Ces inocula ont été incubés à 20°C en conditions de noirceur pendant 14 jours. En parallèle, des semis de sapins (baumier et Fraser) ont été laissés en dormance à -2°C pendant 2 mois. Avant le début de l'expérience, ils ont été transférés à 4°C pendant une semaine et ensuite à 10°C pour une autre semaine. Les semis ont par la suite été repotés dans des pots individuels contenant un mélange autoclavé de tourbe, vermiculite et silice dans un ratio volumique de 2:1:1 additionné d'engrais NPK 18-6-8 à 4kg/m³. Les conditions de la serre expérimentale étaient: une photopériode de 16 heures, des températures de 20°C le jour et de 18°C la nuit et une irrigation de 400 ml quatre fois par semaine. Suivant le débourrement, 100 ml de sol de chaque arbre ont été remplacés par 100 ml de milieu infesté (ou non-infesté pour les contrôles), avec 0.1% (V/V) d'inoculum. Les essais ont été réalisés dans un design de bloc expérimentaux aléatoires, où 3 blocs contenaient chacun 5 réplicats de chaque combinaison isolat/ espèce d'arbre (3 blocs × 2 espèces × (3 isolats + 1 contrôle) × 5 réplicats = 120 semis) (Figure 4B). À chaque deux semaines, des périodes d'inondation de 48 heures des semis ont été ajoutées à partir de la deuxième semaine post infestation afin de favoriser la formation des zoospores responsables de l'infection (Figure 4C). Avant l'infestation et une fois par semaine post infestation, les données suivantes ont été recueillies : la taille du semis à partir du sol, le diamètre au collet, une évaluation visuelle des symptômes (pourcentage de tissu affecté). Au terme de l'essai (12 semaines), le poids sec racinaire fut aussi mesuré. Des échantillons de racines ont aussi été inoculés sur milieux V8-PARPNH dans le but de réisoler les souches utilisées pour l'infestation.

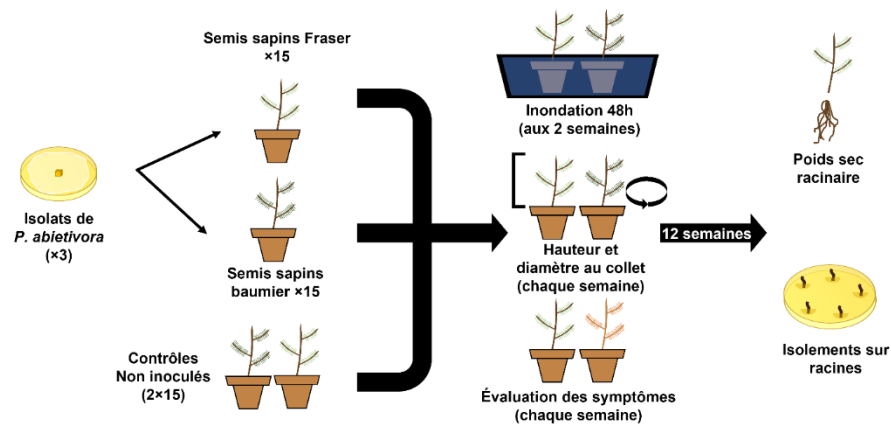


Figure 3 : Représentation de la méthodologie du test de pathogénicité avec *P. abietivora*. Chacun des trois isolats a été utilisé pour infester les sols de 15 semis de sapins baumier et Fraser. Des inondations aux deux semaines favorisent l'émergence des zoospores responsables de l'infection. Chaque semaine des mesures de hauteur et de diamètre au collet ainsi qu'une évaluation visuelle des symptômes ont été effectuées. À la fin de l'essai, le poids sec racinaire a été mesuré et des isollements d'oomycètes à partir de racines ont été tentés.



Figure 4 : Photographies du dispositif expérimental du test de pathogénicité avec *P. abietivora*. A- Inoculum de départ pour une des souches de *P. abietivora*. B- Un bloc expérimental au début du test. C- Dispositif utilisé pour les inondations. Chaque pot était contenu dans un pot plus grand étanchéifié avec un sac en plastique et étaient inondé en laissant le système d'arrosage automatique jusqu'à ce que le niveau de l'eau atteigne 1 cm au-dessus du sol.

Stockage des souches de *Phytophthora*.

Dans le but d'assurer la pérennité des isolats des différentes espèces de *Phytophthora* accumulées au cours du projet, une méthode de cryopréservation en azote liquide a été utilisée. Le principe de cette méthode est basé sur la préservation des isolats à très faible température ($\approx -180^{\circ}\text{C}$) afin de limiter toute activité métabolique qui pourrait endommager le matériel biologique. Le tout se fait dans un liquide protecteur visant à limiter la formation de cristaux de glace et le choc osmotique provoqué par le gel. Deux agents cryoprotecteurs ont été envisagés, soit une solution 10% diméthyl sulfoxyde (DMSO) et une solution composée de 20% glycérol et de 17% lait en poudre. Des tests ont révélé que la viabilité des *Phytophthora* était meilleure après la décongélation dans le mélange glycérol/lait en poudre. La cryopréservation se fait en quelques étapes et deux tubes de cryopréservation sont préparés pour chaque isolat. Tout d'abord, des cultures fraîches de *Phytophthora* sont préparées en transférant un cube d'agar

prélevé au front de croissance du mycélium sur un milieu frais et en l'incubant à 20°C pendant une semaine. De cette culture fraîche, cinq cubes d'agar sont prélevés au front de croissance pour chaque tube de cryopréservation à préparer. Ces cubes sont déposés dans un tube adapté pour la cryogénie, identifié et contenant l'agent de cryoprotecteur et sont incubés à température pièce pour environ 30 minutes. Les tubes sont ensuite transférés dans des récipients permettant un refroidissement à un taux constant de 1°C par minute et sont incubés dans un congélateur à -80°C pendant environ 2 heures. Finalement, les tubes sont transférés dans le cryo-congélateur pour y être entreposés.

Développement d'un essai moléculaire de détection de *P.abietivora* /*P. europaea*

Avec la confirmation de la pathogénicité de *P. abietivora* sur les sapins baumiers et Fraser, un essai de détection moléculaire a été développé afin de faciliter l'identification du pathogène dans divers échantillons environnementaux ou tissus d'arbres malades. L'essai développé utilise la technologie de PCR quantitative (qPCR) de type TaqMan®. Pour développer l'essai de détection, les séquences des cinq régions génétiques séquencées dans le cadre de l'étude ont été récupérées dans des bases de données pour toutes les espèces de *Phytophthora* répertoriées dans des plantations de sapins de Noël, des *Phytophthora* dont l'ADN était disponible au laboratoire, ainsi que quelques espèces génétiquement apparentées à *P. abietivora*. Après avoir vérifié les alignements pour chaque locus (région génétique), la région ITS1-5.8S-ITS2 apparaissait comme celle avec le plus de potentiel au niveau de la variation génétique entre les espèces présentes dans nos alignements. En regardant de plus près les séquences, une région de l'ITS2 a été choisie pour développer la sonde et les amorces (Figure 5). Une fois la séquence des amorces et de la sonde déterminées, il est important de générer une courbe standard pour notre essai. La courbe standard a été générée en utilisant une séquence synthétique d'ADN double brin (gBlock) représentant la cible visée par nos amorces, à laquelle ont été ajoutées une vingtaine de paires de bases supplémentaires de part et d'autre de la séquence. Tous les tests mentionnés ici ont été faits dans le même milieu réactionnel: tampon de réaction 2X SensiFAST Probe No-ROX Mix, amorces à une concentration de 500 µM et sonde à une concentration de 100 µM. Les conditions de PCR étaient d'un temps d'activation de 5 minutes à 95°C, suivi de 40 cycles à 95°C pendant 10 secondes et de 45 secondes à 60°C. Tous les tests ont été effectués à l'aide d'un QuantStudio™5 (Thermofisher). Afin d'évaluer la spécificité du marqueur moléculaire, les ADN de 24 espèces différentes faisant partie de 7 clades distincts ont été utilisés (Tableau 2). Ces ADN ont été dilués pour être tous à une concentration d'environ 100 pg/µL puis 1 µL a été utilisé pour le test. Chaque espèce a été testée en 3 réplicas techniques (3 prélèvements dans la même dilution).

Tableau 2 : Espèces de *Phytophthora* utilisées pour le test de spécificité de l'essai de détection Taqman

Souche	Espèce de Phytophthora	Clade	Associés au genre Abies?
RC2017_1	<i>P. abietivora</i>	7a	Oui
M9554	<i>P. europaea</i>	7a	Oui*
57766	<i>P. cactorum</i>	1a	Oui
140068	<i>P. plurivora</i>	2c	oui
181_25	<i>P. pini</i>	2c	Oui
141_B	<i>P. gonapodyides</i>	6b	Oui
052_A	<i>P. megasperma</i>	6b	Oui
181_B	<i>P. gregata</i>	6b	Oui**
231_A	<i>P. "inconnu"</i>	6b	NA
001_B	<i>P. chlamydospora</i>	6b	Oui
58105_R	<i>P. fragariae</i>	7a	Non
CBS114087	<i>P. cambivora</i>	7a	Oui
BR589	<i>P. cinnamomi</i>	7c	Oui
002_B	<i>P. sp. kelmania</i>	8a	Oui
cbs117693	<i>P. sansomeana</i>	8a	Oui
BR644	<i>P. erythroseptica</i>	8a	Non
cbs113_19	<i>P. cryptogea</i>	8a	Oui
P10333	<i>P. primulae</i>	8b	Non
1341320_3	<i>P. hibernalis</i>	8c	Non
csb101553	<i>P. ramorum</i>	8c	Non
cbs102608	<i>P. lateralis</i>	8c	Non
P10330	<i>P. syringae</i>	8d	Non
cbs407_48	<i>P. quininea</i>	9a	Non
CBS100410	<i>P. boehmeriae</i>	10	non

* Il est possible que *P. abietivora* ait pu être confondu avec *P. europaea* dans les études précédant la description formelle de *P. abietivora* en 2019.

** Cette étude est la première à rapporter l'association entre *P. gregata* et une espèce de conifère (*A. balsamea*).

Afin d'évaluer la sensibilité du test moléculaire, six quantités de cible (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.1 copies de cible) ont été testées en 20 répliques techniques et en utilisant un seuil arbitraire de 40 C_q afin de déterminer une amplification positive. Les données ont été utilisées pour générer un modèle de régression binomiale (modèle probit). Ce modèle a permis d'inférer une LOD_{95%} théorique ainsi qu'un intervalle de confiance sur cette valeur. Ce test a été fait sur le gBlock (utilisé précédemment pour la

courbe standard). Ensuite nous avons pu reporter cette $LOD_{95\%}$ sur notre courbe standard afin de déterminer une valeur C_q seuil (C_q cut-off) au-delà de laquelle un test serait considéré négatif.

Figure 5 : Alignement des espèces de *Phytophthora* choisies pour le développement de l'essai moléculaire de détection de *P.abietivora* / *P. europaea*. La position sur l'alignement est indiquée sur la première ligne et la séquence de référence est celle de la sonde et des amorces se situant sur la deuxième ligne. Les «•» indiquent des nucléotides identiques à ceux de la séquence de référence, les «-» indiquent un «trou» dans la séquence (gap) et les lettres (A,T,C,G) indiquent un polymorphisme. Note : Pour simplifier l'alignement, la séquence de l'amorce «anti-sens» est la séquence inverse et complémentaire (reverse-complement) à celle de l'amorce utilisée dans l'essai.

Développement d'un outil de séquençage Ion Torrent pour la détection des complexes phytophthoréens dans les sapins de Noël.

La méthodologie pour cette section est décrite et détaillée dans la publication scientifique suivante :

Van der Heyden H., Duceppe M-O., Charron G., Tanguay P. et Bilodeau G.J. Oomycetes communities are influenced by land use and disease status in Christmas tree production in Southern Québec, Canada. *Environmental DNA*. 2024;6:e529.

La traduction en français (libre) de l'article scientifique est disponible à l'annexe I

L'article complet dans sa version originale est disponible à l'annexe II.

B. Les complexes bactériens dans l'oignon

Isolation des souches.

L'isolation des souches bactériennes a été effectuée à partir d'oignons symptomatiques (voir figures 6 A et B) qui présentaient une décoloration du feuillage et/ou une macération des tuniques internes du bulbe. Les tissus symptomatiques ont été prélevés selon la méthode de Bradbury (1970). En résumé, trois sections symptomatiques d'environ 1cm² ont été prélevées sur chacun des oignons affectés. Ces échantillons ont été placés séparément dans des pétris, rincés à l'eau stérile, puis dans une solution d'hypochlorite de sodium (1%) et finalement à l'eau stérile sous la hotte. Chaque échantillon a été divisé en deux parties. La première partie a été transférée dans un tube Eppendorf de 2ml contenant approximativement 300µl d'eau stérile et a été écrasée à l'aide d'un petit pilon. La solution a ensuite été étalée par épuisement avec un manche de Koch sur milieu semi-sélectif OEM (Zaid, Bonasera, and Beer, 2012). Pour chacun des pétri-OEM, une colonie typique a été isolée pour chaque phénotype retrouvé. Par la suite, les colonies ont été isolées par épuisement sur milieu LB et incubées à température pièce pendant approximativement 72 heures. Pour chaque souche isolée sur LB, une suspension bactérienne « stock » a été préparée en transférant, à l'aide d'un manche de Koch, 2 ou 3 colonies typiques dans un tube Eppendorf contenant approximativement 400µl d'eau stérile. La suspension a ensuite été mélangée au vortex et conservée à 4°C. La deuxième partie a été coupée finement et 500 mg de cette section a été placée dans un tube de lyse pour l'extraction d'ADN.



Figure 6. Photos illustrant les symptômes de pourriture bactérienne de l'oignon. A) Tunique interne d'un oignon sec infecté par la pourriture bactérienne. B) Symptôme foliaire de pourriture bactérienne.

Extraction d'ADN des souches, PCR-RFLP et séquençage Sanger.

Toutes les extractions d'ADN de souches et d'échantillons d'oignon ont été effectuées avec le FastDNA SPIN Kit (MP biomedical) en suivant la procédure décrite par le manufacturier. Une première identification a été effectuée selon la méthode de PCR-RFLP basée sur l'amplification

d'une portion du gène *gyrB*, tel qu'élaboré par Bonasera, Asselin, and Beer (2014). La PCR a été effectuée à l'aide de la polymérase OneTaq (New England Biolabs Ipswich, MA, USA). Chacune des réactions de 25 µl était composée de 12,271 µl d'eau dd stérile, de 5 µl de solution tampon (5x, incluse avec la polymérase), de 2 µl de mélange dNTP (2,5 mM chacun), de 1,302 µl de chacune des amorces à 10 µM (1480F: 5'-GGCATCATCATCATGACCGA-3' et 2242R: 5'-GTSGTTTCCASAGCTG-3'), de 0,125 µl de polymérase et de 3 µl de la culture stock des souches à tester. Les paramètres de la réaction de PCR étaient de 10 minutes à 95 °C suivis de 42 cycles de 30 secondes à 95 °C, 30 secondes à 50 °C et 50 secondes à 72 °C et finalement d'une extension finale de 10 minutes à 72 °C. Les produits PCR ont ensuite été soumis à une digestion avec l'enzyme de restriction *RsaI* en ajoutant 20 µl d'un mélange réactionnel composé de 16,50 µl d'eau dd stérile, de 2,50 µl de solution tampon NEB 4 (inclus avec l'enzyme de restriction) et de 1,00 µl de *RsaI* (New England Biolabs® Ipswich, MA, USA) à 5,0 µl de produit PCR. La digestion a été effectuée à 37 °C pendant 60 minutes. Les patrons de restrictions ont ensuite pu être visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (Fisher bioagents) 3,5% (w/v) dans lequel a été ajouté du SYBR Safe (Invitrogen®) (Figure 7). Le gel a été effectué dans une solution tampon de 1x Tris-acétate-EDTA. Une échelle de poids moléculaire de 50pb (New England Biolabs Ipswich, MA, USA) a été ajoutée à chacun des gels afin d'estimer la taille de chacun des fragments. Les souches ont ensuite été groupées selon la similarité de leur patron de restriction et comparées à des souches de références de la collection du laboratoire préalablement identifiées. L'identification a ensuite été confirmée par séquençage Sanger du gène *gyrB*.

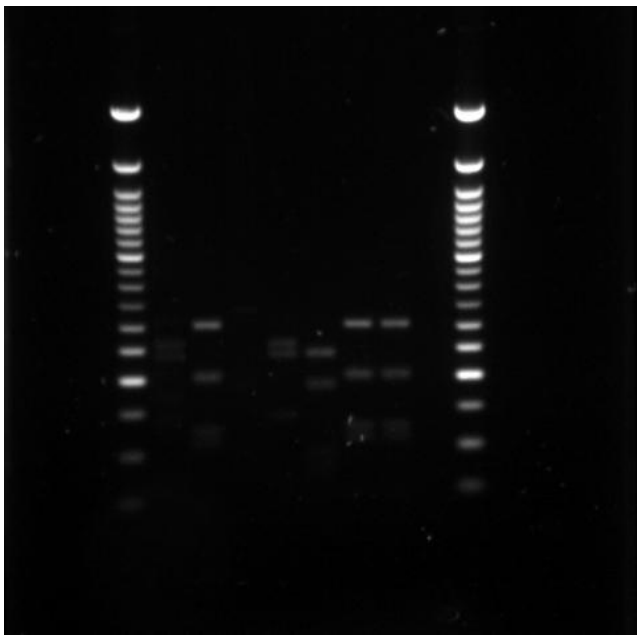


Figure 7 : Exemple de migration sur gel d'agarose d'un PCR RLFP de différentes souches bactériennes.

Tests de pathogénicité.

Les essais de pathogénicité ont été effectués sur des échalotes roses (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*, cv. Conservor). Les échalotes ont été séparées en deux bulbes après que leur tunique externe eu été enlevée. Si l'échalote n'avait qu'un seul bulbe, l'essai a été effectué sur l'échalote entière. Le plateau a été coupé et les bulbes ainsi préparés ont ensuite été placés dans un pétri dont le fond était couvert d'un papier filtre Whatman no.1 décontaminé à l'éthanol. Les souches de *Burkholderia cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. gladiolii*, *Pantoea agglomerans*, *P. allii*, *P. ananatis*, *Enterobacter cloacae* et *Rhizobium aquatilis* utilisées pour les tests de pathogénicité provenaient des tissus symptomatiques isolés précédemment. Ces souches ont été mises en culture sur milieu LB solide à température ambiante pendant 3-4 jours. Les suspensions bactériennes ont été préparées en resuspendant 1-2 colonies dans 300 µl d'eau stérile. Les bulbes ont été perforés à l'aide d'un embout de pipette stérile (P100) et 10 µl de suspension bactérienne ont été injectés dans la perforation. Lorsque l'inoculation était faite avec plus d'une souche à la fois, 50 µl de chacune des suspensions ont été mélangés avant l'inoculation. Les bulbes d'échalotes ont ensuite été incubés 7 jours à la température de la pièce dans un sac de plastique afin de conserver l'humidité et d'éviter les contaminations provenant de l'extérieur. Les inoculations ont tout d'abord été faites avec une seule espèce, puis avec deux. Le degré de macération a ensuite été évalué sur une échelle de 0 à 3 (0-aucune macération; 1-macération de 1 à 33% de la surface du bulbe; 2- 34% à 66% de la surface du bulbe; 3-macération de 67% à 100% de la surface du bulbe (Jacobs et al. 2008; Asselin, Bonasera, and Beer 2016)) (Figure 8). À la suite de l'évaluation du degré de macération, des tissus symptomatiques ont été prélevés pour effectuer une extraction d'ADN et confirmer l'identité de la bactérie initialement inoculée.



Figure 8. Exemple de degré de macération de niveau 3, suite à l'injection de la solution bactérienne.

Séquençage Nanopore.

L'identification des espèces isolées des oignons infectés naturellement ou inoculées artificiellement a également été réalisée par séquençage Nanopore. Cette étape a été réalisée sur l'ADN extrait des souches isolées des oignons symptomatiques et d'échantillons d'ADN extraits directement des tissus d'oignons. L'ADN a été purifié et concentré à l'aide de la trousse AMPure XP (Beckman-Coulter) qui fait appel à des billes magnétiques. Par la suite, l'ADN purifié a été dosé au Qubit4 à l'aide de la trousse dsDNA HS Assay (Thermofisher scientific) et les concentrations d'ADN ont été ajustées pour obtenir 400ng par réaction. Pour le moment, les librairies ont été préparées à l'aide des trousse SQK-RAD004 (rapid sequencing kit) pour les échantillons en simplex et, pour les échantillons en multiplex la trousse SQK-RBK004 (rapid barcoding kit) et les codes à barres originaux. Pour les échantillons analysés en multiplex, des quantités équimolaires d'ADN dotées d'un code à barres ont été utilisées. Pour les échantillons provenant de tissus infectés (échantillons environnementaux), la trousse SQK-NBD112.96 (native barcoding kit) a été utilisée.

Le séquençage a été effectué sur des cellules MinION d'Oxford Nanopore (ONT) (FLO-MIN106D, version R9.4.1) connectées à un appareil Mk1B opéré par le logiciel MinKNOW (version 4.1.2). Les librairies ont été chargées selon les recommandations du fabricant en mélangeant 12 µl de la librairie au tampon de séquençage et aux billes de chargement. Les réactions de séquençage ont été arrêtées au bout de 16h.

Pour tous les échantillons, l'identification des nucléobases (basecalling) a été faite à partir des fichiers Fast5 contenant les données brutes, en utilisant le logiciel Guppy-gpu qui utilise des réseaux de neurones pour convertir le signal brut en séquence d'ADN dans un format fastq. Il s'agit de la méthode recommandée par Nanopore. Le système de classification taxonomique Kraken2 est

utilisé pour l'identification au niveau des espèces dans tous les échantillons. Les scripts nécessaires à l'identification des nucléobases se trouvent à l'annexe III.

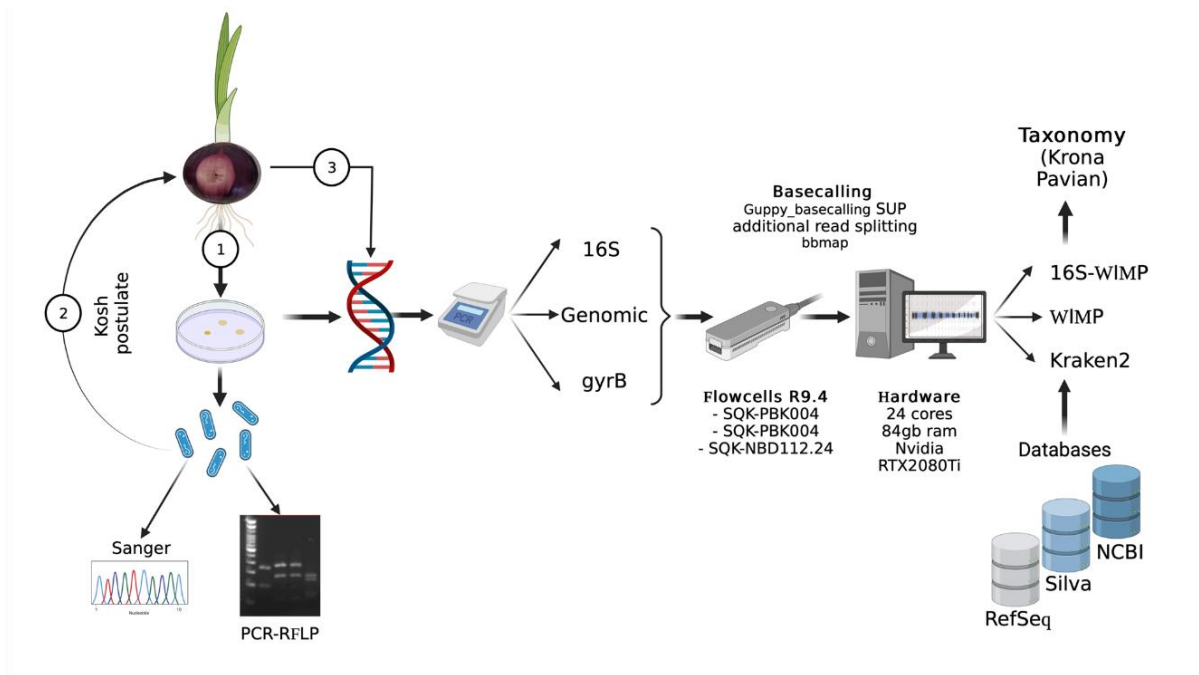


Figure 9. Représentation des différentes méthodologies d'identification des agents pathogènes de la pourriture bactérienne de l'oignon.

C. Les formes spéciales de *Fusarium oxysporum* dans les cultures maraîchères et la fraise

Isolation des souches de *F. oxysporum*.

Les souches utilisées dans le cadre de ce projet provenaient tout d'abord de la collection de Phytodata, isolées entre 2015 et 2018 dans le cadre d'un autre projet (PV-3.2-DP-PHYT-6). De plus, des souches ont été isolées à partir de plants affectés provenant de différentes cultures (laitue, épinards, oignons, etc.), principalement grâce à la collaboration de conseillers et agronomes du réseau. Pour l'isolation des souches à partir des tissus symptomatiques, les parties infectées ont été stérilisées avec de l'hypochlorite de sodium à 1 %, lavées deux fois avec de l'eau distillée, séchées à l'air et placées sur gélose PDA (potato dextrose agar) amendée de novobioce (1%) et WA (water agar) pendant 24 h à 48 h. Après incubation, des morceaux de gélose contenant du mycélium ont été prélevés en bordure du pétri et transférés sur de nouveaux pétri-PDA pour purification. Cette étape a été répétée jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Enfin, le mycélium a été utilisé pour l'extraction de l'ADN. Des souches de *F. oxysporum* ont également été obtenues du LEDP. Enfin, des souches de références ont été acquises de Cedarlane (Burlington, Ont.) (ATCCMYA3040 de *lactucae* Race 1, ATCC62592 de *cepae* et ATCC90152 de *spinaciae*).

Extraction d'ADN des souches, PCR et séquençage.

Un maximum de 200 mg de mycélium frais a été utilisé pour l'extraction d'ADN à l'aide de la trousse commerciale FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals) selon la procédure recommandée par le fabricant. La concentration et la qualité de chaque échantillon d'ADN ont été estimées à l'aide d'un spectrophotomètre Nano-Drop lite (Thermo Scientific) et la concentration en ADN a été ajustée à environ 10-50 ng/µl. Afin de s'assurer que nos souches étaient bel et bien des *Fusarium oxysporum*, une identification par séquençage a été effectuée sur le gène TEF (facteur d'élongation). Les séquences ont ensuite été comparées à la base de données Nucleotide collection (nr/nt) du NCBI par le biais de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Gènes codant pour des protéines effectrices sécrétées dans le xylème (SIX genes i.e secreted in xylem gene) pour l'identification des formes spéciales de *Fusarium oxysporum*.

Les différentes souches phytopathogènes de *Fusarium oxysporum* sont spécifiques à des hôtes particuliers et forment ainsi plus de 150 sous-espèces nommées formes spéciales (Huang et al. 2019). Dans certains cas, ces formes spéciales se subdivisent selon les cultivars hôtes pour former des races spécifiques à certaines variétés à l'intérieur d'une même culture (Jangir et al. 2021). Plusieurs de ces formes spéciales sont connues pour sécréter de petites protéines effectrices (SIX) dans le xylème de leur hôte, contribuant ainsi à leur virulence (Jangir et al. 2021). À ce jour, 14

effecteurs SIX ont été rapportés. Les différentes formes spéciales de *F. oxysporum* n'ont pas toutes le même profil de gènes SIX et la séquence génétique d'un même SIX est souvent différente entre les formes spéciales, c'est pourquoi ces gènes sont utilisés dans l'identification des formes spéciales et de leurs races (Jangir et al. 2021).

En ce qui concerne les cultures à l'étude dans ce projet, des gènes SIX ont été rapportés pour *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* (SIX 1, 2, 3, 4, 6, 7,8, 9, 10, 11, 12, 13 et 14) pour *F. oxysporum* f.sp *cepae* (SIX 3, 5, 7, 9, 10, 12 et 14) pour *F. oxysporum* f.sp *spinaciae* (SIX 8 et 14), pour *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* et *melonis* (SIX 6), pour *F. oxysporum* f.sp *radicis-cucumerinum* (SIX 6, 9, 11 et 13), pour *F. oxysporum* f.sp *fragariae* (SIX 1 et 13) et pour *F. oxysporum* f.sp *apii* (SIX 1) (Tableau 3). Aucun gène SIX n'est rapporté dans la littérature pour *F. oxysporum* f.spp *lactucae* et *radicis-lycopersici*.

Plusieurs tests PCR ciblant les gènes SIX et visant l'identification des formes spéciales sont disponibles dans la littérature. Certains tests ont été conçus pour être spécifiques à une forme spéciale particulière (van Dam et al. 2018), alors que d'autres paires d'amorces sont décrites comme étant universelles, c'est-à-dire qu'elles amplifient le gène SIX ciblé, peu importe la forme spéciale (Czislowski et al. 2021). Dans ce projet, les 15 paires d'amorces universelles décrites par Czislowski et al. (2021) ont été testées sur la totalité des souches de *Fusarium oxysporum* disponibles dans la collection (158 souches). De plus, des paires d'amorces spécifiques ciblant le gène SIX 14 de *F. oxysporum* f.sp *cepae* (paire SIX14-FOC), le SIX 8 de *F. oxysporum* f.sp *spinaciae* (paire SIX8), SIX 13 de *radicis-cucumerinum* (paire fp7305/fp7322) ainsi que le SIX 3 de *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* (paire SIX3) (utilisé pour l'identification des races) ont également été testées pour les souches provenant des cultures hôtes d'intérêts. La liste des différentes paires d'amorces testées et leurs séquences, les composantes des mélanges réactionnels ainsi que les conditions des PCR sont disponibles dans le protocole fourni à l'annexe IV.

Tableau 3. Tableau résumant la mention dans la littérature de la présence (+) ou de l’absence (-) des gènes SIX pour les formes spéciales étudiées dans le cadre du projet.

Gène SIX	Tomate				<i>radicis- lycopersici</i>	Concombre			Épinard			Allium	Fraise	Céleri	Laitue	Autres formes spéciales possédant le gène
	<i>lycopersici</i>					<i>radicis- cucume rinum</i>	<i>cucume rinum</i>	<i>melonis</i>	<i>spinaciae</i>			<i>cepae</i>	<i>fragariae</i>	<i>apii</i>	<i>lactucae</i>	
	Race x	Race 1	Race 2	Race 3		Groupe x	Groupe 1	Groupe 2	Races 2,3,4							
SIX 1	+ ^{ab}	+ ^g	+ ^g	+ ^g	- ^a	- ^a	- ^a	+ ^{dc} / - ^a	- ^a	- ^g	- ^g	- ^{dg}	+ ⁱ	+ ^h	ND	<i>conglutinans, cubense, canariensis, lini, pisi, coriandrii, lagenaria, momordicae, medicagini</i>
SIX 2	+ ^a	+ ^g	+ ^g	+ ^g	- ^a	- ^a	- ^a	ND	- ^a	- ^g	- ^g	- ^{dg}	- ⁱ	ND	ND	<i>cubense</i>
SIX 3	+ ^a	+ ^g	+ ^g	+ ^g	- ^a	- ^a	- ^a	ND	- ^a	- ^g	- ^g	+ ^{dg}	- ⁱ	ND	ND	<i>conglutinans,</i>
SIX 4	+ ^a / - ^a	+ ^{dg}	- ^g	- ^{dg}	- ^a	- ^a	- ^a	ND	- ^a	+ ^g	- ^g	- ^{dg}	- ⁱ	ND	ND	<i>niveum, conglutinans, cubense</i>
SIX 5	+ ^a	+ ^g	+ ^g	+ ^g	- ^a	- ^a	- ^a	ND	- ^a	- ^g	- ^g	+ ^{dg}	- ⁱ	ND	ND	
SIX 6	+ ^a	+ ^g	+ ^g	+ ^g	- ^a	+ ^{ac}	+ ^c / - ^a	+ ^a	- ^a	- ^g	- ^g	- ^{dg}	+ ^j	ND	ND	<i>cubense, vasinfectum, Colletotrichum sp., betae, phaseoli, niveum, passiflora</i>
SIX 7	+ ^{ab}	+ ^g	+ ^g	+ ^g	- ^a	- ^a	- ^a	ND	- ^a	- ^g	- ^g	+ ^{dg}	- ⁱ	ND	ND	<i>cubense, dianthii, lili, canariensis, lini, pisi R1, narcissi, freesia, zingiberi</i>
SIX 8	+ ^b	+ ^g	+ ^g	+ ^g	ND	ND	ND	ND		- ^g	+ ^g	- ^{dg}	- ⁱ	ND	ND	<i>palmarum, phaseoli, cubense, passiflora, niveum, conglutinans</i>
SIX 9	+ ⁱ	+ ^g	+ ^g	+ ^g	ND	+ ^c	ND	ND		- ^g	- ^g	+ ^{dg}	- ⁱ	ND	ND	<i>dianthi, narcissi, palmarum, zingiberi, cubense, niveum, passiflora,</i>
SIX 10	+ ⁱ	+ ^g	+ ^g	+ ^g	ND	ND	ND	ND		- ^g	- ^g	+ ^{dg}	- ⁱ	ND	ND	<i>canariensis, lini, pisi R1, narcissi, freesia, zingiberi</i>
SIX 11	+ ⁱ	+ ^g	+ ^g	+ ^g	ND	+ ^c	ND	ND		- ^g	+ ^g (une seule souche)	- ^{dg}	- ⁱ	ND	ND	<i>phaseoli, pisi R1, passiflora, niveum, vasinfectum, medicagini</i>
SIX 12	+ ⁱ	+ ^g	+ ^g	+ ^g	ND	ND	ND	ND		- ^g	- ^g	+ ^{dg}	- ⁱ	ND	ND	<i>canariensis, lini, pisi R1, narcissi, freesia, zingiberi</i>
SIX 13	+ ⁱ	+ ^g	+ ^g	+ ^g	ND	+ ^{cf}	ND	ND		- ^g	- ^g	- ^{dg}	+ ⁱ	ND	ND	<i>lini, pisi R2-3, freesia, niveum, vasinfectum, medicaginis, cubense</i>
SIX 14	+ ⁱ	+ ^g	+ ^g	+ ^g	ND	ND	ND	ND		+ ^g	+ ^g	+ ^{dg}	- ⁱ	ND	ND	<i>pisi R1-2, freesia, vasinfectum</i>

^a Lievens et al. 2009, ^b Meldrum et al. 2012, ^c Rocha et al. 2016, ^d Taylor et al. 2016, ^e van Dam et al. 2017, ^f Van Dam et al. 2018, ^g Batson et al. 2019, ^h Henry et al. 2020 (additional file 17),

ⁱ Czislawski et al. 2021, ^j. Dilla-Ermita et al. 2023. ND, information non disponible.

Autres gènes ou régions d'intérêt pour l'identification des formes spéciales.

D'autres gènes ou régions d'intérêt sont également rapportés dans la littérature et ont été évalués dans le cadre du projet. Les différents PCR ou PCR quantitatif évalués sont listés dans le tableau 4. Les protocoles spécifiques à chacun des tests et qui incluent les séquences des amorces et sondes, les composantes du mélange réactionnel ainsi que les conditions PCR sont disponibles en annexe (voir tableau 4)

Tableau 4. Nom de la cible, type d'analyse, gène ou région amplifié, numéro de l'annexe du protocole et article en référence pour les gènes ou régions autre que les gènes SIX étudiés dans le projet.

Cible	Type	Gène ou région amplifié	Protocoles	Références
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> race 1	PCR	Inter-transposon	Annexe V	Pasquali et al. 2007
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cepaie</i>	PCR	Effecteur C5	Annexe VI	Taylor et al. 2016
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>	PCR	Élément transposable	Annexe VII	Suga et al. 2013
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>spinaciae</i>	qPCR	Effecteur <i>Fos</i>	Annexe VIII	Batson et al. 2023
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>apii</i> races 2 et 4	PCR	Gène effecteur putatif	Annexe IX	Epstein et al. 2017
Formes spéciales des cucurbitacées	PCR	Gène HPEG (<i>hypothetical protein encoding gene</i>)	Annexe X	Van Dam et al. 2018

Évaluation de la spécificité des tests PCR et qPCR

Pour chacun des tests, une évaluation de la spécificité a été réalisée. Pour ce faire, l'ADN des souches ATCC MYA 3040 (*F.oxysporum* f.sp. *lactucae* race 1), ATCC 62592 (*F.oxysporum* f.sp. *cepaie*), ATCC90152 (*F.oxysporum* f.sp. *spinaciae*), 44771 (*F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3), 1427.02 ou 1427.03 (*F.oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*) et 46223 (*F.oxysporum* f.sp. *fragariae*) a été testé dans chaque test. Les conditions de la PCR ont été ajustées dans les cas où l'amplification d'un fragment non spécifique de même longueur que la cible était détectée.

Pour le test de PCR quantitatif spécifique à *F. oxysporum* f.sp. *spinaciae*, la spécificité a été réalisée à partir d'ADN de culture pure. Les extractions d'ADN ont été préalablement dosées à l'aide du NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo scientific), puis la concentration de toutes les souches a été ajustée à 1 ng/μl. Les extraits d'ADN ont été testés au PCR quantitatif selon le protocole établi.

Test de pathogénicité

Afin de s'assurer que les souches des formes spéciales identifiées par les marqueurs génétiques étaient bel et bien des souches phytopathogènes, des tests de pathogénicité ont été réalisés pour toutes les cultures.

Test de pathogénicité des souches de Fusarium oxysporum isolées de la tomate.

Les racines de transplants de tomates cv. Cœur de bœuf rose de trois semaines ont été trempées dans 5 ml d'une solution concentrée à $10E6$ spores/ml. Les plants ont par la suite été transplantés individuellement dans des pots de 5po X 7po remplis de terreau. Trois plants de tomate ont été inoculés pour chaque souche testée, et trois témoins non inoculés ont été ajoutés à chaque expérience. Le terreau avait subi le même traitement de chaleur que pour les essais de laitues et épinards. Les pots ont par la suite été placés en chambre de croissance sous une température et humidité relative constante de 28°C et 60% avec une luminosité de 16 heures. Les plants ont été observés à chaque semaine pendant 9 ou 10 semaines afin d'observer des symptômes de fusariose (branche ou côté de plant qui fane), après quoi les plants ont été retirés de leur terreau et les tiges ont été coupées en deux afin de pouvoir observer une décoloration du système vasculaire.

Test de pathogénicité des souches de Fusarium oxysporum isolées d'allium sur des bulbes d'échalotes françaises.

Les essais de pathogénicité ont été effectués sur des échalotes roses (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*, cv. Conservor). Les échalotes ont été séparées en deux bulbes après que leur tunique externe eut été enlevée. Si l'échalote n'avait qu'un seul bulbe, l'essai était effectué sur l'échalote entière. Les bulbes ont premièrement été décontaminés en surface à l'aide d'éthanol 70% et ont ensuite été placés dans un contenant fermé stérile dont le fond était couvert d'un papier absorbant imbibé d'eau stérile. Un morceau de gélose contenant du mycélium a ensuite été placé sur le plateau de chaque échalote et celles-ci ont été incubées à 20°C pendant 6 à 9 semaines dans le noir. Pour chaque souche, 3 bulbes ont été inoculés et posés dans le même contenant. Dans chaque essai, un témoin positif (souche ATCC62592, 3 répliques) ainsi qu'un témoin non traité (morceau de PDA, 3 répliques) ont été ajoutés. Après la période d'incubation, les bulbes ont été coupés en deux et un pourcentage de tissu atteint a été noté. À partir de ce pourcentage, un indice de sévérité propre à chaque souche a été déterminé selon les critères suivants : Nul = 0% atteint pour les 3 répliques, Faible = le pourcentage est inférieur à 10% pour les 3 répliques, Intermédiaire = ne correspond ni à nul, ni à faible ni à sévère, Sévère = le pourcentage est égal ou supérieur à 50% pour les 3 répliques (voir figure 10).

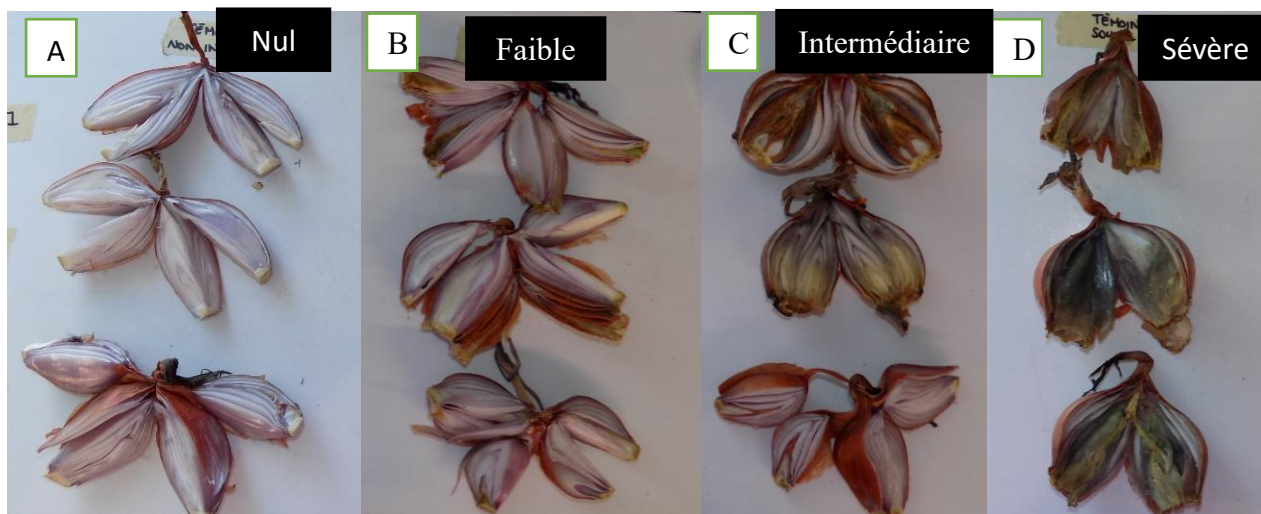


Figure 10. Échelle de sévérité de la fusariose du plateau de l'oignon causée par *F. oxysporum* f.sp. *cepae* A) nul. B) faible. C) intermédiaire et D) sévère.

Test de pathogénicité des souches de Fusarium oxysporum isolées d'épinards

Des semences d'épinards cv. C2-606 non-traitées ont été semées directement dans 250 ml de terreau inoculé à une concentration de 12 500 spores/ml de terreau. Le terreau avait subi le même traitement de chaleur que pour les essais de laitues. Pour chaque souche testée, 3 réplicas ont été inoculés. Chaque réplica consistait en 16 semences d'épinards semées directement dans le terreau inoculé. Dans chaque essai, la souche ATCC 90152 a été utilisée comme témoin positif et un témoin non traité (250 ml d'eau) a également été ajouté. Les pots ont par la suite été placés en chambre de croissance à 22°C le jour et 18°C la nuit pendant 10 jours, après quoi la température a été augmentée à 28°C le jour et 24°C la nuit pendant 11 jours. Après les 3 semaines d'incubation, les plantules ont été retirées du terreau puis évaluées selon leurs symptômes aériens et racinaires. Les résultats ont été consignés sous forme de pourcentage de plantules atteintes.

Tests de pathogénicité des souches de Fusarium oxysporum isolées de cucurbitacées

Les racines de plants de concombre cv. Green ligh F1 au stade d'une vraie feuille ont été trempées dans 10 ml d'une solution de spores concentrée à 2E6 spores/ml. Les plants ont par la suite été transplantés dans des pots de 10 cm X 10 cm remplis de terreau (terre noire à jardin), puis placés en chambre de croissance sous une température constante de 22°C, température favorisant autant le développement de f.sp. *cucumerinum* que de f.sp. *radicis-cucumerinum*. Trois plants ont été inoculés par souche testée, et trois témoins non inoculés ont également été ajoutés à l'expérience. Les plants ont été gardés en chambre de croissance pendant 30 jours, après quoi les symptômes de fusariose ont été évalués. Premièrement, les signes de branche ou côté de plant qui fane ont été notés (signe de fusariose causée par f.sp. *cucumerinum*). Ensuite, les racines ont été retirées du terreau et lavées, après quoi la tige et racine principales ont été coupées sur la longueur afin

d'observer des signes de décoloration des tissus vasculaires (signe de fusariose causée par *f.sp. radicis-cucumerinum*).

Test de pathogénicité des souches de Fusarium oxysporum isolées de laitues

Des laitues cv. New Red Fire (sensible à la race 1 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*) de trois semaines ont été trempées dans 10 ml d'une solution de spores concentrée à 1E6 spores/ml puis transplantées individuellement dans des pots carrés de 10 cm X 10 cm X 8 cm remplis de terreau (terre noire à jardin), à raison de 4 répliques par souche testée. L'activité biologique du terreau avait préalablement été diminuée en le faisant chauffer à deux reprises à 90°C pendant 30 min. Après la transplantation, les laitues ont été placées pendant 6 semaines dans une chambre de croissance maintenue à une humidité relative constante de 70% et une température de 25°C entre 6 :00 am et 19 :00 pm (lumière) et de 20°C entre 19 :01 pm et 6 :01 am (noirceur). Après la période d'incubation, les laitues ont été retirées de leur terreau, les racines ont été nettoyées puis coupées en deux sur la longueur afin d'évaluer la décoloration du xylème. Une cote de sévérité des symptômes a été notée selon les critères suivants : 0 = le xylème est blanc, 1 = le xylème est légèrement jauni, 2 = le xylème est jauni et 3 = le xylème est jaune foncé et/ou noir (Figure 11). Une note globale a été attribuée à chaque souche en additionnant les cotes données à chaque réplique.



Figure 11. Échelle de sévérité de la pourriture racinaire de la laitue (cv New Red Fire) Causée par *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* race 1. A) 0, B) 1, C) 2 et D) 3

Test de pathogénicité des souches de Fusarium oxysporum isolées du céleri

Comme nous n'avons pas été en mesure de produire nos propres semis de céleri (difficulté à avoir un bon taux de germination et des germinations synchronisées), nous avons dû avoir recours à des semis disponibles chez un producteur de céleri. Toutefois, la variété testée ainsi que sa sensibilité à la fusariose sont inconnues. Les racines des transplants de céleri ont été trempées dans 10 ml d'une solution concentrée à 1E6 spores/ml puis transplantées dans des pots ronds de 17 cm de diamètre par 18 cm de profond. Les pots ont été remplis de terreau non stérile, puis amendés d'une dose de fertilisant de type 4-6-10. Les pots ont été placés à l'extérieur du 14 juin 2023 au 15 août

2023, car leur dimension était trop grande pour les faire en chambres de croissance intérieures. Trois plants ont été inoculés par souche testée, et trois témoins non inoculés ont également été ajoutés à l'expérience. Les symptômes visuels des parties aériennes (dépérissement) et du plateau racinaire (décoloration des tissus intérieurs de la tige, près du plateau racinaire) ont par la suite été notés.

Test de pathogénicité de deux souches de Fusarium oxysporum isolées de la fraise

Des fraisiers cv. Ruby Ann de 5 semaines ont été transplantés dans un terreau inoculé à l'aide de morceaux de PDA contenant les souches à tester, à raison d'un tiers d'une gélose de 60 mm par pot de 10 cm X 10 cm X 8 cm. Trois plants de fraisier ont été inoculés par souche testée, et deux témoins non inoculés ont également été ajoutés à l'expérience. Les plants ont par la suite été placés en chambre de croissance sous humidité relative constante de 60%, avec une température de 28°C le jour et 20°C la nuit, avec 1 heure à 24°C avant de passer entre le jour et la nuit. La luminosité était réglée à 12 heures de lumière. Après 1 mois, les signes de dépérissement ont été pris en note pour chaque plant.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS

A. Les complexes phytophthoréens dans le sapin de Noël

Isolement des souches d'oomycètes du genre *Phytophthora*.

Pour les 240 échantillons prélevés au champ en 2019, 1200 disques foliaires issus du piégeage sur feuilles de Rhododendron, et 400 radicelles ont été mis en culture sur milieu gélose semi-sélectif pour les *Phytophthora*. Le tiers des disques foliaires et environ 20% des radicelles ont développé une croissance microbienne (Tableau 5). Pour les disques foliaires, la croissance pouvait être observée dans toutes les catégories d'échantillons (malades, sain en plantation et sain en forêt, Figure 12A), cependant le nombre de disques en croissance était significativement différent entre les échantillons provenant d'arbres malades et les autres (Figure 12B). Parmi ces isolats, 62 isolats provenant de 32 échantillons indépendants ont été formellement identifiés comme faisant partie du genre *Phytophthora* (Tableau 6). La méthode de piégeage avec les feuilles de rhododendron semble un peu plus efficace pour récupérer des *Phytophthora*, avec environ 13% des isolats obtenus (54 isolats de *Phytophthora* sur 401) comparé à environ 9,5% (8 isolats de *Phytophthora* sur 84) pour la méthode d'isolement à partir des racines. Les données pour l'échantillonnage 2020 ne sont pas disponibles.

Tableau 5: Statistiques d'isolement des *Phytophthora* (Échantillonnage 2019)

	Sols	Radicelles
Nombre total d'échantillons	240	80
Échantillons mis en croissance	1200 (disques foliaires)	400 (radicelles)
Échantillons avec croissance	401 (33,4%)	84 (21%)
Isolats de <i>Phytophthora</i> obtenu	54 (13,5%)	8 (9,5%)
Espèces de <i>Phytophthora</i> obtenues	8	4

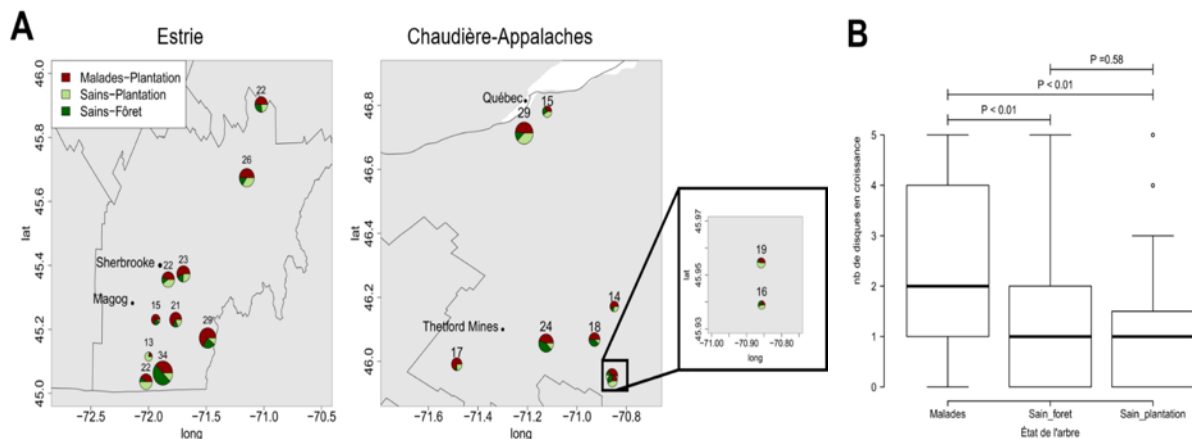


Figure 12: Succès d'isolement de microorganismes selon la région et l'état de l'arbre. A. Répartition des isolats dans chaque région et chez chaque producteur. Les graphiques en pointes de tartes représentent la proportion des isolats obtenus avec les échantillons d'arbres malades, sains en plantation et sains en forêt pour chaque site (nombre d'isolats total obtenu indiqué au-dessus). B. Distribution du nombre de disques en croissance selon l'état des arbres. Les valeurs P sont indiquées pour chaque comparaison (ANOVA à un facteur, $F(2,237) = 14.82$, corrigées avec le Tukey HSD).

Identifications des isolats

À l'aide des séquences des ITS, il a été possible de déterminer que neuf espèces différentes étaient représentées parmi les 62 *Phytophthora* isolés. Selon l'analyse phylogénétique, ces espèces font partie de trois clades du genre *Phytophthora*, soit les clades 6, 7 et 8 (Figure 13). Parmi ces espèces, *Phytophthora europaea* a particulièrement attiré notre attention. Nos isolats identifiés comme *P. europaea* sont, après vérification des séquences, génétiquement différents des « vrais » isolats de *P. europaea*. Cette espèce fait partie du clade 7a, qui est composé d'espèces originaires majoritairement d'Europe et d'Asie de l'Est. Après avoir communiqué avec des experts sur le sujet, il s'avérerait que nos isolats appartiendraient en fait à l'espèce *Phytophthora abietivora*, décrite récemment (2019) à partir d'isollements faits sur des sapins Fraser présentant des symptômes de pourriture racinaire au Connecticut et en Pennsylvanie.

Tableau 6 : Liste des isolats de *Phytophthora* (Échantillonnage 2019)

Isolat	Meilleure identification moléculaire	État de l'arbre	Site
001_A	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Malade	1
001_B	<i>Phytophthora chlamydospora</i>	Malade	1
001_C	<i>Phytophthora chlamydospora</i>	Malade	1
001_D	<i>Phytophthora chlamydospora</i>	Malade	1
001_E	<i>Phytophthora chlamydospora</i>	Malade	1
002_C	<i>Phytophthora kelmania</i>	Malade	1
003_B	<i>Phytophthora mississippiiae</i>	Malade	1
003_C	<i>Phytophthora mississippiiae</i>	Malade	1
003_D	<i>Phytophthora mississippiiae</i>	Malade	1

003_E	<i>Phytophthora mississippiiae</i>	Malade	1
014_C	<i>Phytophthora europaea</i>	Malade	2
052_A	<i>Phytophthora megasperma</i>	Malade	5
052_B	<i>Phytophthora megasperma</i>	Malade	5
062_E	<i>Phytophthora europaea</i>	Malade	6
097_A	<i>Phytophthora europaea</i>	Malade	9
097_D	<i>Phytophthora europaea</i>	Malade	9
141_C	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Forêt*	18
141_D	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Forêt	18
142_A2	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Forêt	18
142_C2	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Forêt	18
142_D	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Forêt	18
142_E	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Forêt	18
148_A	<i>Phytophthora europaea</i>	Malade	17
148_B	<i>Phytophthora europaea</i>	Malade	17
153_B	<i>Phytophthora megasperma</i>	Forêt	17
157_A	<i>Phytophthora gregata</i>	Malade	16
157_B	<i>Phytophthora gregata</i>	Malade	16
160_A1	<i>Phytophthora sp. H-6/02</i>	Malade	16
160_A2	<i>Phytophthora megasperma</i>	Malade	16
160_B	<i>Phytophthora sp. H-6/02</i>	Malade	16
160_D	<i>Phytophthora sp. H-6/02</i>	Malade	16
160_E	<i>Phytophthora sp. H-6/02</i>	Malade	16
168_A	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Forêt	16
168_B	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Forêt	16
168_C	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Forêt	16
170_B	<i>Phytophthora europaea</i>	Malade	13
171_D	<i>Phytophthora gregata</i>	Malade	13
181_A	<i>Phytophthora gregata</i>	Malade	11
181_B	<i>Phytophthora gregata</i>	Malade	11
181_C	<i>Phytophthora gregata</i>	Malade	11
181_E	<i>Phytophthora gregata</i>	Malade	11
195_B	<i>Phytophthora europaea</i>	Malade	15
207_C	<i>Phytophthora europaea</i>	Malade	14
231_A	<i>Phytophthora sp. H-6/02</i>	Malade	19
231_D	<i>Phytophthora megasperma</i>	Malade	19
237_B1	<i>Phytophthora sp. H-6/02</i>	Forêt	19
237_C1	<i>Phytophthora sp. H-6/02</i>	Forêt	19
237_E	<i>Phytophthora sp. H-6/02</i>	Forêt	19
R_001_A	<i>Phytophthora kelmania</i>	Malade	1
R_001_B2	<i>Phytophthora kelmania</i>	Malade	1
R_013_A	<i>Phytophthora europaea</i>	Malade	2
R_088_A	<i>Phytophthora megasperma</i>	Malade	8
R_135_A1	<i>Phytophthora sp. H-6/02</i>	Malade	18
R_157_A	<i>Phytophthora sp. H-6/02</i>	Malade	16
R_229_A	<i>Phytophthora megasperma</i>	Malade	19
002_B	<i>Phytophthora kelmania</i>	Malade	1
135_B	<i>Phytophthora chlamydospora</i>	Malade	18
141_B	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Forêt	18
141_E	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	Forêt	18
170_D	<i>Phytophthora europaea</i>	Malade	13
195_A	<i>Phytophthora inundata</i>	Malade	15
R_001_B2	<i>Phytophthora kelmania</i>	Malade	1

*Les échantillons de forêt sont considérés comme étant sains.

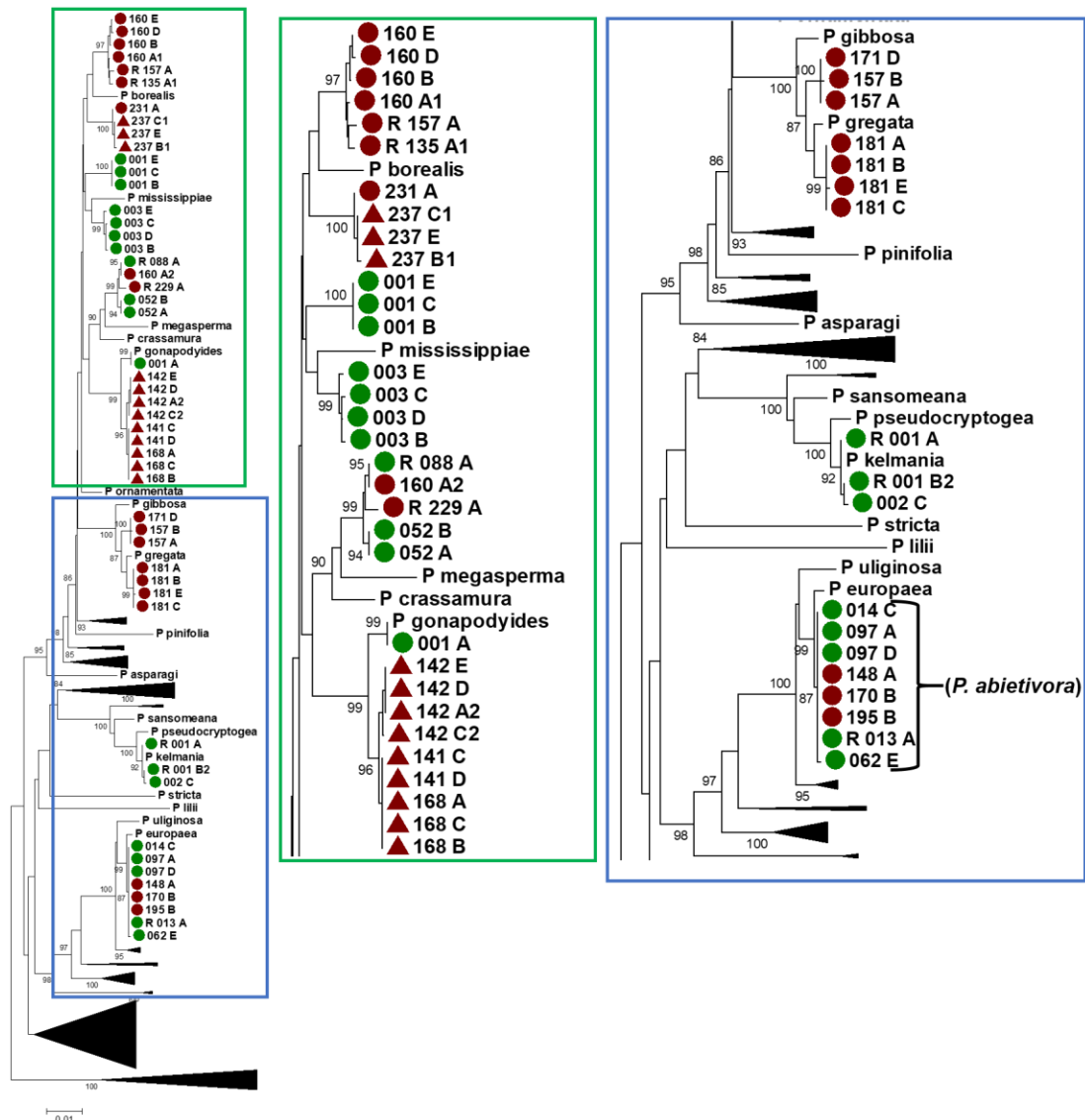


Figure 13: Arbre phylogénétique « Neighbor-Joining » des *Phytophthora*. Inféré par l'analyse phylogénétique de 176 séquences (50 des isolats et 126 espèces connues). Les séquences étaient composées de la concaténation de trois loci (ITS, Cytochrome oxydase I et Bêta-Tubuline, 1843 nucléotides au total). Toutes les positions contenant des « gaps » ont été éliminées. Le pourcentage de soutien de chaque nœud est indiqué (10 000 répliqua par « bootstrap »). Les analyses ont été effectuées avec le logiciel MEGA.

Test de pathogénicité

Le test de pathogénicité a premièrement confirmé que *P. abietivora* est un pathogène agressif sur le sapin Fraser, comme démontré initialement par Li et al. (2019). Le pouvoir pathogène de *P. abietivora* sur les sapins baumiers a également été mis en évidence, ce qui constitue un résultat inédit pour cette espèce. Selon les résultats obtenus, la pathogénicité de *P. abietivora* sur les semis de sapin baumier est plus modérée, mais cette différence est statistiquement significative. En effet, les symptômes reliés à la maladie de pourriture racinaire semblent progresser un peu plus lentement

dans les semis de sapin baumier, ce qui résulte en une mortalité plus faible après 12 semaines (Figure 14 A, B). En accord avec ces résultats, on peut observer des différences significatives entre les sapins infestés par les isolats de *P. abietivora* et les contrôles non-infestés au niveau de la taille, du diamètre au collet et du poids sec des racines. En calculant la différence entre le début et la fin de l'expérience, on peut constater que les semis de sapins Fraser infestés ont eu une croissance plus faible en hauteur et en diamètre. Aussi, le poids sec des racines était de beaucoup inférieur à celui des contrôles Fraser (Figure 15A, C, E). Comme les semis de sapin baumier ont eu une progression plus lente de la maladie, les différences avec les contrôles sont beaucoup moins marquées, mais sont toutefois présentes (Figure 15B, D, F). Une souche en particulier (062_E) semble plus agressive que les autres testées sur sapins baumiers. Cette souche donne des résultats similaires à ceux obtenus sur sapins Fraser pour la progression de la maladie (beaucoup plus de sapins affectés par les symptômes), ce qui se répercute sur les autres mesures et lui donne un profil similaire sur les deux espèces de sapins. La souche 062_E a été isolée par baiting et provient de l'échantillonnage 2019 en Chaudière-Appalache. Il serait intéressant à long terme de déterminer les bases génétiques de cette différence de pathogénicité sur les sapins baumiers pour mieux comprendre la maladie chez les sapins. Il est à noter que le test de pathogénicité effectué dans le cadre de cette étude ne répond pas aux critères de deux des quatre postulats de Koch et ne peut donc être considéré comme un test de ces postulats. Le premier postulat stipule que l'organisme causant la maladie doit être isolé directement d'individus malades, ce qui n'est pas le cas pour le test de pathogénicité puisque les souches ont été obtenues par baiting du sol associé à des arbres malades. Le quatrième postulat nécessite l'isolement de l'organisme causant la maladie chez des sujets inoculés, après le développement des symptômes. Ce critère n'a pas été rempli au cours de l'expérimentation car il n'a pas été possible d'obtenir des souches de *P. abietivora* lors de la mise en culture des racines. Un moyen indirect a cependant été utilisé en extrayant l'ADN de radicelles stérilisées en surface et en amplifiant la région génétique de la sous-unité 1 de la NADH déshydrogénase.

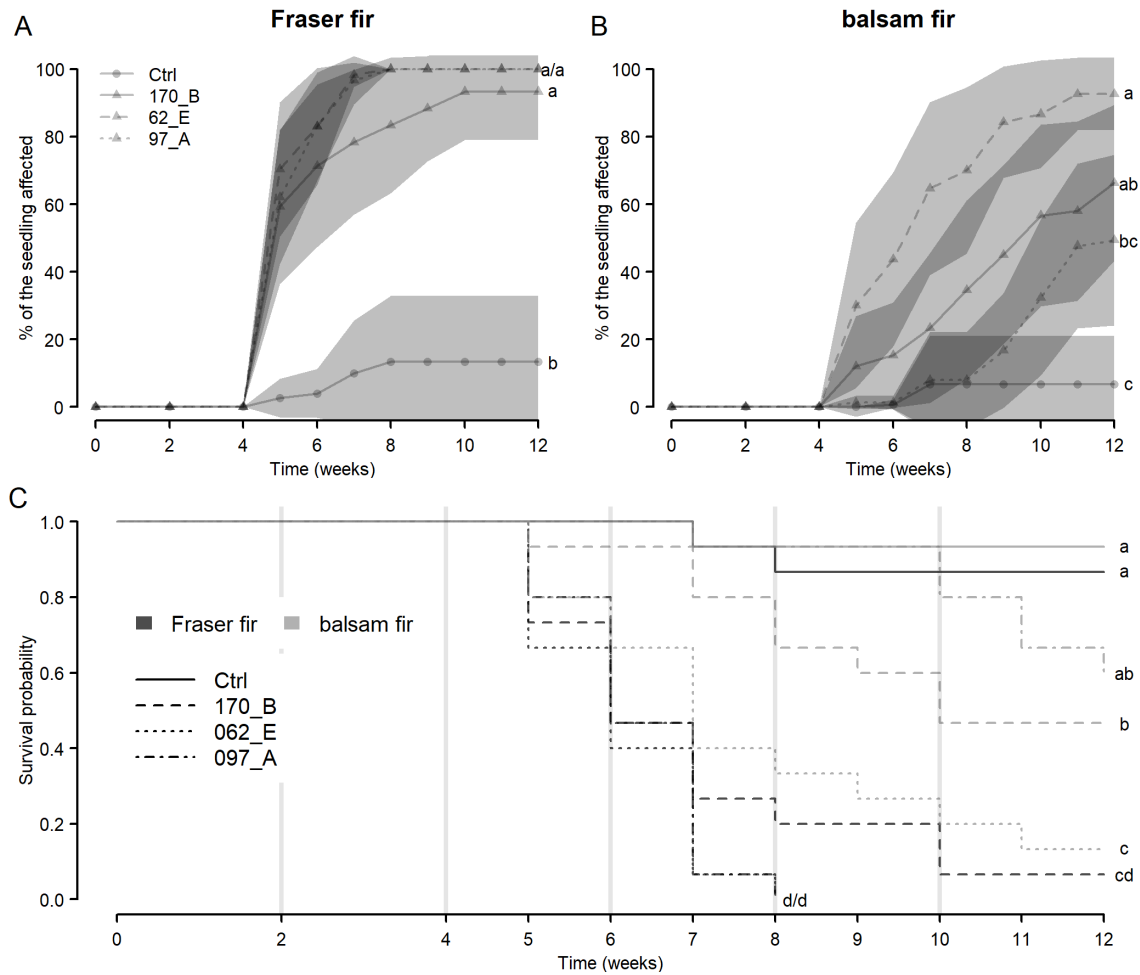


Figure 14 : La progression rapide des symptômes de Pourriture phytophthoréenne des racines (PPR) entraîne la mort des semis dans les groupes infestés. A,B- Courbe de progression de la maladie chez les semis Fraser et baumier représentée par le pourcentage des tissus atteints par le symptômes de la maladie. Les points de données représentent la moyenne des réplicats à chaque temps post-infestation et les zones ombragées représentent l'intervalle de confiance à 95%. Les lettres représentent les différences significatives de l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) selon le test de Dunn bilatéral. C- La probabilité de survie varie entre les semis infestés et non infestés (Ctrl). Les lignes verticales grises représentent les périodes d'inondation de 48 heures et les lettres indiquent les différences significatives entre les courbes de survie (test Log-Rank).

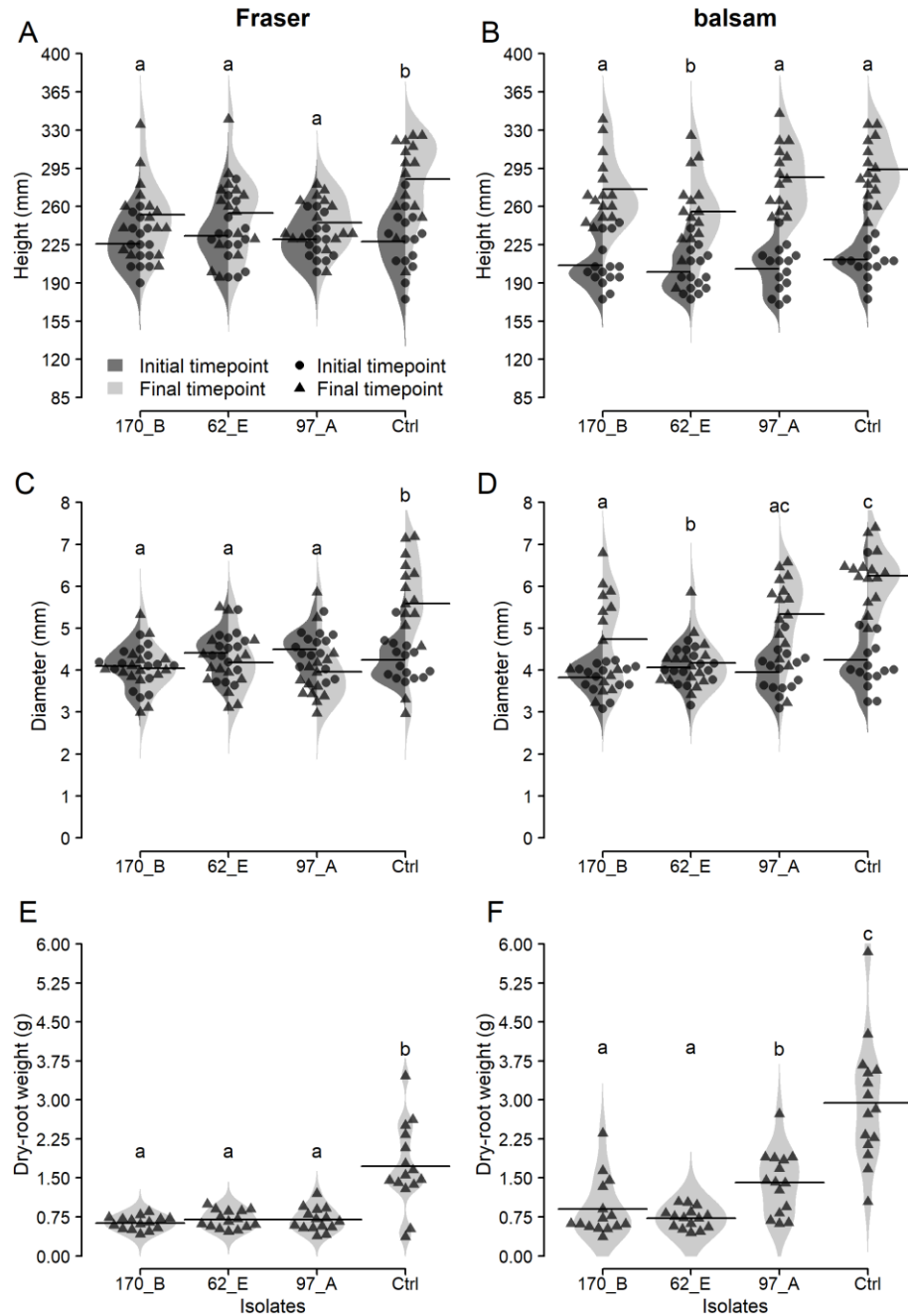


Figure 15 : L'infestation par *P. abietivora* du sol des semis de sapins affecte leur croissance. A, B- «Beanplots» des tailles initiales et finales des semis de sapins Fraser et baumier pour chaque isolat utilisé pour infester le sol et les contrôles non-infestés. Les lettres indiquent les différences significatives au niveau de l'augmentation de la hauteur des semis (test de Dunn). C, D- «Beanplots» des diamètres au collet des semis de sapins Fraser et baumier pour chaque isolat utilisé pour infester le sol et les contrôles non-infestés. Les lettres indiquent les différences significatives au niveau de l'augmentation du diamètre au collet des semis (test de dunn). E, F- «Beanplots» du poids sec racinaire des semis de sapins Fraser et baumier pour chaque isolat utilisé pour infester le sol et les contrôles non-infestés. Les lettres indiquent les différences significatives au niveau du poids sec racinaire.

Stockage des souches de Phytophthora

À partir des souches obtenues lors des échantillonnages, les bases d'une collection de *Phytophthora* ont été posées au Centre de foresterie des Laurentides (CFL). En général, les souches répondaient bien à la cryogénie et toutes les souches testées ont été capable de donner des cultures vivantes. Toutes les souches isolées qui ont pu être maintenues en culture depuis 2019 sont dorénavant entreposées dans des congélateurs cryogéniques au CFL (local SS.41). À ces souches ont été ajoutées des souches de *Phytophthora europaea* et *Phytophthora abietivora* obtenues de laboratoires européens et américains. Certaines souches provenant du laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection y sont également conservées (Annexe XI, fichier numérique). Cette ressource pourrait être utile à divers groupes de recherche étudiant divers aspects de la PPR ou les organismes du genre *Phytophthora* en général.

Essai moléculaire de détection de *P.abietivora*/*P. europaea*

Les amorces développées pour l'essai de détection moléculaire génèrent un fragment d'amplification (amplicon) de 180 paires de bases (Tableau 7). Comme il est possible de constater, il y a très peu de variation génétique inter-espèce au sein des séquences des amorces (résultats non illustrés). Ces dernières ne confèrent donc aucune spécificité à l'essai. La sonde elle, est hautement spécifique et ne se lie, en théorie, qu'à la séquence de *P. europaea* et *P. abietivora* (qui partagent une séquence identique à cet endroit). Cette double spécificité ne devrait pas poser de problème lorsque cet essai est utilisé dans le contexte des productions de sapins, puisque *P. europaea* est une espèce décrite comme étant inféodée aux chênes.

Tableau 7 : Caractéristiques des amorces et de la sonde utilisées pour l'essai de détection moléculaire de *P. europaea*/*P. abietivora*

Amorce/Sonde	Séquence	Longueur (pb)	Température de fusion (T _m)	Longueur Amplicon (pb)
Pabi_ITS_F1	CCCACAGTATATTTCAGTATTCAA	23	55.0°C	180
Pabi_ITS_R	TGAACCGTATCAACCCA	17	53.8°C	
Pabi ITS Probe	AGCCACCAGGACAAGC	16	60.0°C	

Les trois espèces les plus proches génétiquement de *P. abietivora*/*P. europaea* utilisées dans l'alignement ayant servi à développer les amorces et la sonde sont *P. fragariae*, *P. cinnamomi* et *P. cambivora*. Malgré leur proximité génétique, leurs séquences contiennent assez de polymorphismes nucléotidiques pour empêcher la liaison efficace de la sonde dans les conditions utilisées. Les paramètres de la courbe standard de l'essai se trouvent dans les normes acceptables

pour ce genre d'essai (Figure 16). La pente est de 3.493 et l'efficacité est de 93% alors qu'on s'attend à une pente de 3.32 et à une efficacité de 100% dans un qPCR « parfait », où le nombre de molécules double à chaque cycle. Le coefficient de détermination linéaire (R^2) de 0.992 indique que la prédiction faite par la courbe de régression est excellente à l'intérieur des limites de la courbe (ici entre 100 et 1 000 000 de copies de cible).

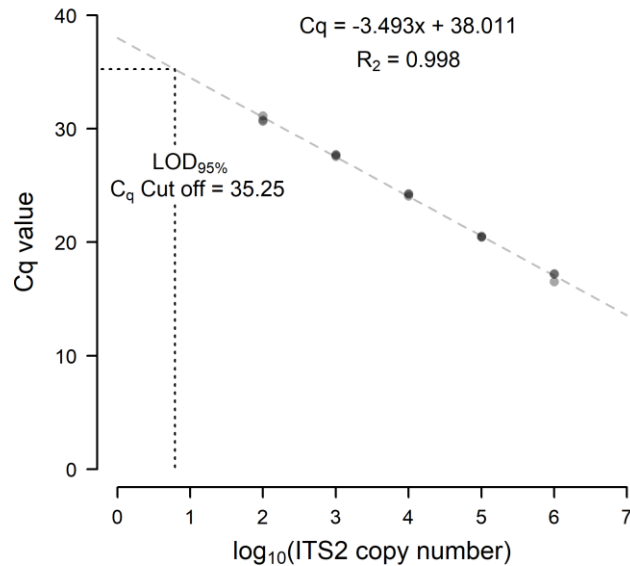


Figure 16 : Courbe standard de l'essai de détection de *P. europaea*/*P. abietivora*.

Comme mentionné précédemment, la spécificité de l'essai a été testée sur un Panel de 24 espèces. Dans les conditions utilisées, *P. europaea* et *P. abietivora* sont les deux seules espèces à avoir donné un signal positif évident et reproductible. Trois espèces, *P. sansomeana*, *P. cactorum* et la souche 231_A, ont donné des résultats positifs tardifs ($C_q > 35$) de manière non reproductible (un seul des trois réplicats, Tableau 8). Dans le cas de la souche 231_A, on a pu confirmer la présence de contamination avec de l'ADN de *P. abietivora* en séquençant l'amplicon obtenu. Il est à noter que des réactions croisées entraînant des signaux faux positifs ont été observées pour *P. fragariae* et *P. cambivora* lorsque la concentration d'ADN génomique utilisée pour le test est supérieure à 1 ng/μL (Tableau 8). D'autres espèces donnent aussi des résultats faux positifs à des concentrations élevées d'ADN, mais de manière assez tardive pour semer un doute sur leur positivité réelle. Il serait cependant surprenant d'obtenir de telles réactions à partir d'ADN provenant d'échantillons environnementaux puisque les microorganismes sont rarement en quantité assez élevée pour offrir des concentrations se rapprochant des concentrations problématiques.

Tableau 8 : Résultats du test de spécificité de l'essai de détection.

Souche	Espèce de Phytophthora	Clade	C _q moyen (100 pg)	Réplicats positifs (100 pg)	C _q moyen (1ng)	Réplicats positifs (1 ng)
RC2017_1	<i>P. abietivora</i>	7a	19.55	3/3	13.41	3/3
M9554	<i>P. europaea</i>	7a	19.52	3/3	12.78	3/3
57766	<i>P. cactorum</i>	1a	35.74	1/3	Indéterminé	0/3
140068	<i>P. plurivora</i>	2c	Indéterminé	0/3	Indéterminé	0/3
181_25	<i>P. pini</i>	2c	Indéterminé	0/3	33.5	2/3
141_B	<i>P. gonapodyides</i>	6b	Indéterminé	0/3	Indéterminé	0/3
052_A	<i>P. megasperma</i>	6b	Indéterminé	0/3	38.78	3/3
181_B	<i>P. gregata</i>	6b	Indéterminé	0/3	Indéterminé	0/3
231_A	<i>P. "inconnu"</i>	6b	37.29	1/3	29.30	3/3
001_B	<i>P. chlamydospora</i>	6b	Indéterminé	0/3	Indéterminé	0/3
58105_R	<i>P. fragariae</i>	7a	Indéterminé	0/3	25.93	3/3
CBS114087	<i>P. cambivora</i>	7a	Indéterminé	0/3	13.74	3/3
BR589	<i>P. cinnamomi</i>	7c	Indéterminé	0/3	Indéterminé	0/3
002_B	<i>P. sp. kelmania</i>	8a	Indéterminé	0/3	35.01	2/3
cbs117693	<i>P. sansomeana</i>	8a	37.89	1/3	Indéterminé	0/3
BR644	<i>P. erythroseptica</i>	8a	Indéterminé	0/3	37.63	1/3
cbs113_19	<i>P. cryptogea</i>	8a	Indéterminé	0/3	34.25	1/3
P10333	<i>P. primulae</i>	8b	Indéterminé	0/3	37.23	2/3
1341320_3	<i>P. hibernalis</i>	8c	Indéterminé	0/3	30.45	2/3
csb101553	<i>P. ramorum</i>	8c	Indéterminé	0/3	Indéterminé	0/3
cbs102608	<i>P. lateralis</i>	8c	Indéterminé	0/3	Indéterminé	0/3
P10330	<i>P. syringae</i>	8d	Indéterminé	0/3	Indéterminé	0/3
cbs407_48	<i>P. quininea</i>	9a	Indéterminé	0/3	Indéterminé	0/3
CBS100410	<i>P. boehmeriae</i>	10	Indéterminé	0/3	35.94	1/3

La sensibilité de l'essai a été testée sur le gBlock de la séquence cible en faisant le test en 20 réplicas techniques sur un panel de quantité de cible allant de 3.1 à 100 copies. Le modèle de régression binomiale nous a permis de déterminer que l'essai de détection moléculaire développé pour *P. abietivora* a une LOD_{95%} de 6.16 copies avec un intervalle de confiance à 95% se situant entre 4.65 copies et 22.17 copies (Figure 17). Compte tenu que l'ITS est une séquence se retrouvant en plusieurs copies dans les génomes (jusqu'à 376 dans *Phytophthora cactorum*), notre test serait assez sensible pour détecter la présence d'un faible nombre de cellules de *P. abietivora* dans un échantillon donné. La valeur seuil de C_q a été établie à 35.25 (Figure 16), ce qui éliminerait les signaux faux positifs observés à 100 pg lors du test de spécificité.

L'essai moléculaire de détection de *P.abietivora*/*P. europaea* est l'objet d'un article scientifique soumis pour publication en 2024. Une première version du manuscrit est disponible à l'annexe XII.

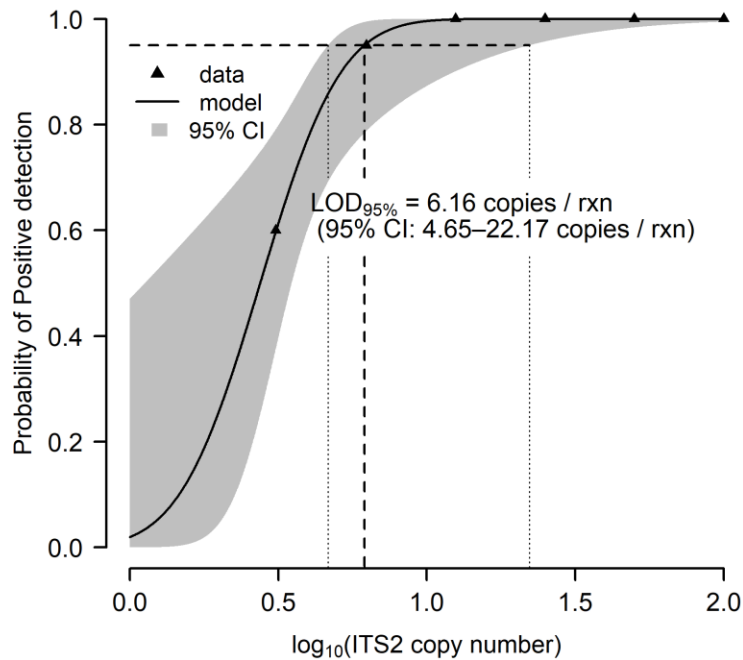


Figure 17: Régression binomiale des résultats du test de sensibilité du test de *P. abietivorum*

Étude des communautés d'oomycètes dans la culture de sapins de Noël par la technologie Ion Torrent

Les forêts sont menacées par de nombreux facteurs de stress naturels intensifiés par les changements climatiques et les activités anthropiques, qui tendent à accroître leur vulnérabilité aux ravageurs et aux agents pathogènes. Par conséquent, les cas de déclin ou de dépérissement des forêts liés aux oomycètes augmentent dans les paysages naturels, urbains et agricoles. C'est dans ce contexte que les producteurs d'arbres de Noël du sud du Québec connaissent des problèmes de pourriture des racines, avec des incidences signalées allant jusqu'à 25%. Dans la section précédente, sept *Phytophthora spp.* ont été associés à ce problème de pourriture des racines, mais la diversité globale des oomycètes n'avait pas encore été étudiée. Par conséquent, dans cette étude, nous avons utilisé une approche de métabarcodes (voir figure 18) pour fournir un aperçu de la diversité, de la richesse et de la composition de la communauté d'oomycètes dans les plantations de sapins par rapport aux forêts naturelles environnantes. Nous avons montré que les clusters *P. cryptogea*, *P. europaea*, *P. sansomeana* et *P. megasperma* étaient significativement plus abondants dans les sols collectés dans les plantations sous des arbres malades, et avons confirmé que le cluster *P. europaea* (y compris *P. abietivora*) était le plus souvent associé aux arbres présentant des symptômes semblables à ceux de la pourriture des racines causée par le *Phytophthora*. Enfin, nous rapportons

que l'utilisation des terres (activités anthropiques) façonne la diversité des oomycètes, tandis que les plantations peuvent servir de portes d'entrées potentielles et envahir les forêts naturelles. En fait, les résultats présentés ici suggèrent que le groupe *P. europaea* pourrait déjà avoir franchi cette frontière et que d'autres espèces pourraient suivre, soulignant l'importance d'une meilleure surveillance de la diversité des oomycètes dans divers environnements. Une meilleure compréhension de la composition des communautés d'oomycètes provenant d'arbres sains et malsains dans des environnements naturels et perturbés peut nous aider à comprendre comment les activités anthropiques influencent les communautés d'oomycètes, à en apprendre davantage sur leur rôle dans les écosystèmes et à déduire des schémas de migration et d'introduction d'espèces non indigènes. Cependant, la présence et l'abondance de ces espèces doivent encore être confirmées soit par un isolement direct, soit par des outils moléculaires spécifiques à l'espèce, soit par de nouvelles régions géniques, tels que le gène *rps10*, permettant la résolution de ces groupes au niveau de l'espèce

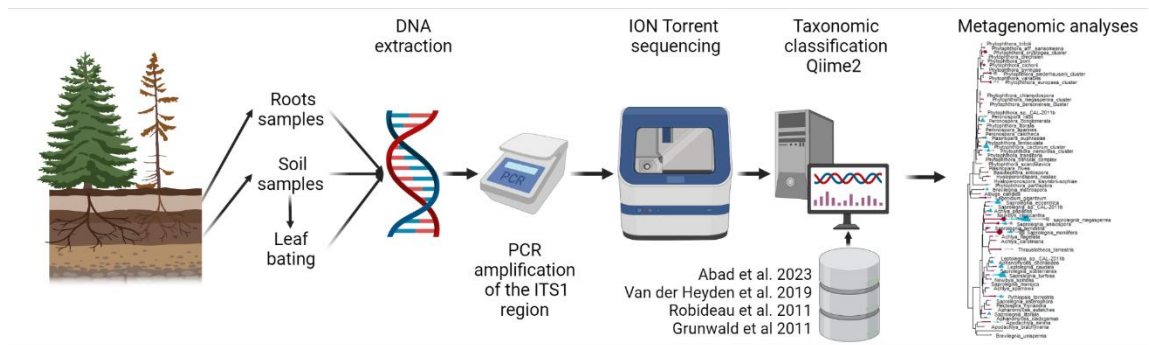


Figure 18. Aperçu du pipeline d'analyse utilisé dans cette étude (adapté de Figure 2 Overview of the analytical pipeline used in this study page https://github.com/hvanderheyden/cimdec_phytophthora)

Pour plus d'information, toutes les données et résultats ont été soumis et acceptés au journal Environmental DNA : Van der Heyden H., Duceppe M-O., Charron G., Tanguay P et Bilodeau G.J. 2024. Oomycetes communities are influenced by land use and disease status in Christmas tree production in Southern Québec Canada. Environmental DNA. 6. 10.1002/edn3.529. (voir article complet à l'annexe II)

Le pipeline utilisé pour le filtrage de qualité, l'extraction ITS1 et la génération des données de séquences représentatives est disponible via la page GitHub : https://github.com/duceppemo/QIIME2_ITS. Des scripts supplémentaires utilisés pour

analyser les données, ainsi que les données converties en un seul objet phyloseq, sont disponibles via la page GitHub https://github.com/hvanderheyden/cimdec_phytophthora.

N.B. Il est à noter que le séquençage illumina peut aussi bien être évalué suivant le même pipeline qu'utilisé ici pour le *Ion Torrent*. Des études similaires pour l'identification des *Phytophthora* avec le séquençage MinIon de Nanopore sont en cours d'évaluation dans le cadre de d'autres projets reliés avec ITS et la région RPS10, avec d'autres pipelines bio-informatiques (communication personnelle Hervé Van der Heyden).

B. Les complexes bactériens dans l'oignon

Au total nous disposons de 231 souches bactériennes isolées de l'oignon et séquencées pour le gène *gyrb* (tableau 9). Toutes les souches ont été isolées d'oignons présentant des symptômes foliaires ou du bulbe.

Tableau 9. Liste des souches séquencées sur le gène *gyrb*.

Acronyme	Nom complet	Nombre de souches séquencées
Raqu	<i>Rahnella aquatilis</i>	43
Kcow	<i>Kosakonia cowanii</i>	33
Pagg	<i>Pantoea agglomerans</i>	29
Pana	<i>Pantoea ananatis</i>	22
Eclo	<i>Enterobacter cloacae</i>	18
Psp	<i>Pseudomonas sp.</i>	14
Pall	<i>Pantoea allii</i>	12
Bglad	<i>Burkholderia gladioli</i>	9
Bcen	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	8
Bsp	<i>Burkholderia sp.</i>	8
Pflu	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7
Dzea	<i>Dickeya zeae</i>	5
Koxy	<i>Klebsiella oxytoca</i>	5
Bcep	<i>Burkholderia cepacia complex</i>	4
Psp	<i>Pantoea sp.</i>	4
Espp	<i>Enterobacter spp.</i>	3
Lade	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	2
Pput	<i>Pseudomonas putida</i>	2
Acal	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1
Pspu	<i>Pandoraea sputorum</i>	1
Rorn	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1

Les essais d'inoculation réalisés en simplex suggèrent une certaine variation de la pathogénicité pour certaines espèces. Alors que toutes les souches de *B. cenocepacia* et *B. gladioli* étaient pathogènes, seulement 25% des souches de *B. cepacia* l'étaient. Pour les souches de *Pantoea spp.* entre 24 et 56% des souches causaient des symptômes dépendamment des espèces (Tableau 10). Pour les inoculations en duplex, toutes les paires testées sauf la paire *B. cepacia* – *P. agglomerans* causaient des symptômes.

Tableau 10. Résumés des tests de pathogénicité réalisés en simplex ou en duplex.

Espèces testées	Pourcentage de souches causant des symptômes	Pourcentage de souches ne causant pas de symptômes	Espèces testées	Pourcentage de combinaisons causant des symptômes	Pourcentage de combinaisons ne causant pas de symptômes
Bcen	100	0	Bcen-Eclo	100	0
Bcep	25	75	Bcen-Raqu	100	0
Bgla	100	0	Bcep-Bcen	100	0
Eclo	0	100	Bcep-Bgla	100	0
Pagg	24	76	Bcep-Eclo	100	0
Pall	37	63	Bcep-Pagg	0	100
Pana	56	44	Bcep-Pana	100	0
Raqu	0	100	Bcep-Raqu	100	0
Pagg-Pall	100	0	Bgla-Bcen	100	0
Pagg-Pana	100	0	Bgla-Eclo	100	0
Pagg-Raqu	100	0	Bgla-Pagg	100	0
Pall-Bcen	100	0	Bgla-Pana	100	0
Pall-Bcep	100	0	Bgla-Raqu	100	0
Pall-Bgla	100	0	Eclo-Raqu	100	0
Pall-Eclo	100	0	Pagg-Bcen	100	0
Pall-Pana	100	0	Pagg-Bgla	100	0
Pall-Raqu	100	0	Pagg-Eclo	100	0
Pana-Bcen	100	0	Pana-Raqu	100	0
Pana-Eclo	100	0			

Les résultats de séquençage obtenus à l'aide du minION sont cohérents avec les résultats des inoculations. De façon générale, lorsque de l'ADN extrait de colonies bactériennes était utilisé, plus de 93% des lectures étaient classifiées et près de 99% des séquences assignées étaient d'origine bactérienne. Cependant, lorsque l'ADN utilisé était extrait directement de l'oignon, un peu moins de 30% des séquences étaient classifiées seulement, mais plus de 91% de celles-ci étaient identifiées comme étant d'origine bactérienne. La distribution de la qualité des lectures se situait entre 9.5 et 10.5 en moyenne et la longueur des fragments obtenus variait de 840 à 3800 pb, en moyenne (Figure 19-21). Comme l'extraction d'ADN est faite directement d'oignons symptomatiques, ce résultat était attendu, la majorité des séquences non classifiées appartenant à l'oignon lui-même. Pour corriger ce déséquilibre, il est possible avec le séquenceur minION de réaliser un séquençage sélectif de molécules uniques en temps réel en inversant individuellement le voltage à travers des nanopores spécifiques. Ainsi, les molécules d'ADN peuvent être rejetées et remplacées par de nouvelles molécules permettant un séquençage ciblé pour enrichir, appauvrir ou obtenir une couverture spécifique dans un ensemble de lectures afin de répondre à une question

biologique précise, dans notre cas l'identification d'une ou de plusieurs espèces spécifiques (diagnostic) (Payne et al. 2020).

L'analyse réalisée avec l'algorithme de classification taxonomique WIMP a permis d'identifier les bonnes espèces lorsque le kit de séquençage rapide sans code à barres a été utilisé (Figure 19). WIMP a aussi permis d'identifier adéquatement les espèces lorsque l'ADN utilisé provenait de fragment d'oignon, sans passer par l'isolation sur milieu de culture (Figure 20). Lorsque l'inoculation était réalisée en duplex, les résultats étaient généralement cohérents avec les résultats attendus (Tableau 11). Similairement, pour les échantillons infectés naturellement (Figure 21) les résultats obtenus sont également cohérents avec les résultats attendus. Les figures 19, 20 et 21 montrent les résultats pour des échantillons multiplexés avec ou sans codes à barres et un seuil de détection fixé à 3% d'abondance. Lorsqu'un code à barres est utilisé, il est possible de récupérer l'information pour chaque échantillon.

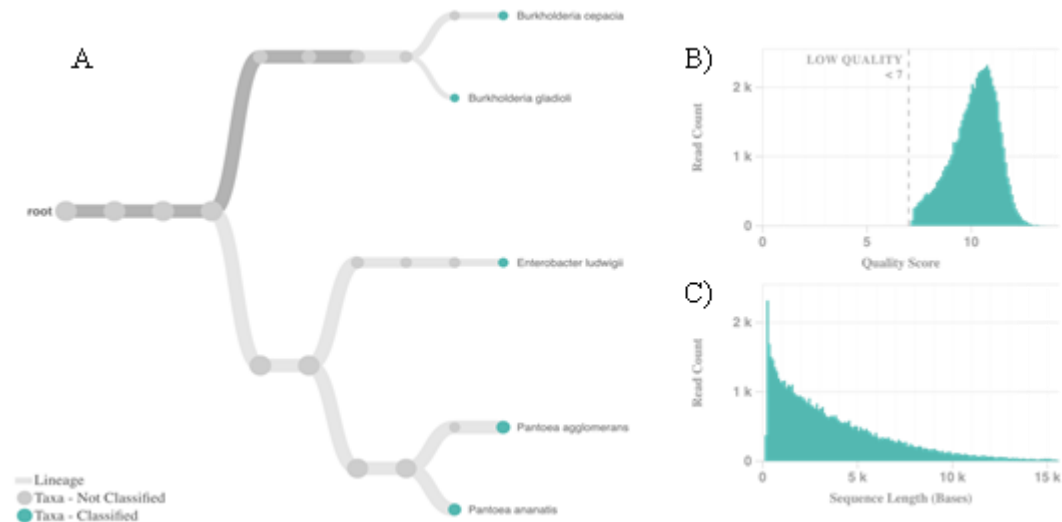


Figure 19. Exemples de résultats d'analyses obtenus avec la plateforme WIMP pour un mélange d'ADN extraits de cinq souches de bactéries et un seuil de détection fixé à 3% d'abondance. Le panneau A) représente un arbre taxonomique tandis que le panneau B) montre la distribution de la qualité des lectures et C) la distribution des tailles de fragments séquencés.

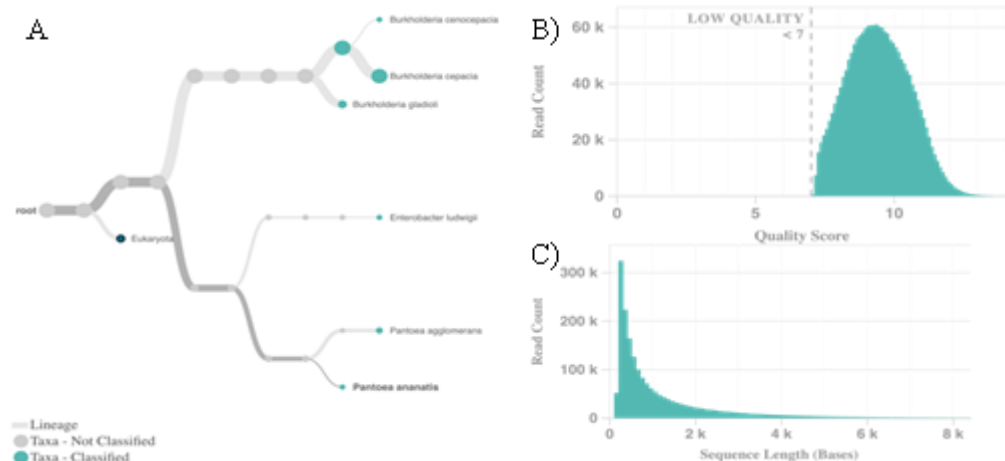


Figure 20. Résultats d'analyses obtenus pour l'expérience 244-155 avec la plateforme WINP pour un mélange de 12 ADN's extraits d'oignons infectés artificiellement et un seuil de détection fixé à 3% d'abondance. Le panneau A) représente un arbre taxonomique tandis que le panneau B) montre la distribution de la qualité des lectures et C) la distribution des tailles de fragments séquencés. Les résultats démultiplexés sont présentés au tableau 3.

Tableau 11. Résultats démultiplexés de l'analyse obtenus pour l'expérience 244-155 avec la plateforme WINP pour un mélange de 12 ADN's extraits d'oignons infectés artificiellement.

Número d'échantillon	Inoculation	Résultats minION
6-246	<i>P. alli</i> + <i>B. gladioli</i>	<i>B. gladioli</i>
9-6	<i>P. ananatis</i> + <i>P. alli</i>	<i>P. ananatis</i>
9-66	<i>P. ananatis</i> + <i>P. agglomerans</i>	<i>P. ananatis</i> et <i>P. agglomerans</i>
9-92	<i>P. ananatis</i> + <i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
9-98	<i>P. ananatis</i> + <i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i> et <i>B. cepacia</i>
9-246	<i>P. ananatis</i> + <i>B. gladioli</i>	<i>B. gladioli</i>
66-92	<i>P. agglomerans</i> + <i>B. cepacia</i>	<i>P. agglomerans</i> et <i>B. cepacia</i>
66-98	<i>P. agglomerans</i> + <i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cepacia</i> et <i>B. cenocepacia</i>
66-246	<i>P. agglomerans</i> + <i>B. gladioli</i>	<i>P. agglomerans</i> et <i>B. gladioli</i>
246-12	<i>B. gladioli</i> + <i>E. cloacae</i>	<i>B. gladioli</i> et <i>E. cloacae</i>
246-92	<i>B. gladioli</i> + <i>B. cepacia</i>	<i>B. gladioli</i>
246-89	<i>B. gladioli</i> + <i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>

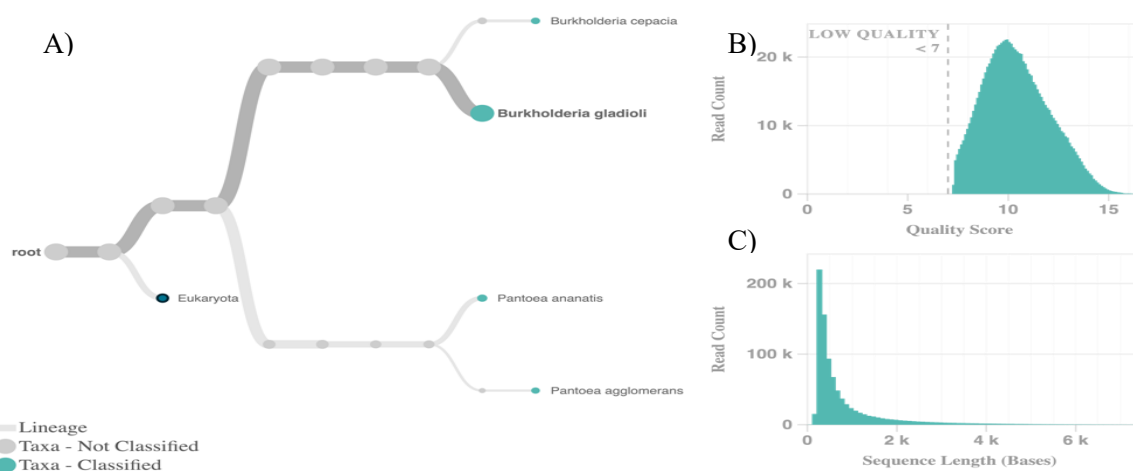


Figure 21. Résultats d'analyses obtenus pour l'expérience 245-160 avec la plateforme WINP pour un mélange de 12 ADN's extraits d'oignons infectés naturellement. Le panneau A) représente un arbre taxonomique tandis que le panneau B) montre la distribution de la qualité des lectures et C) la distribution des tailles de fragments séquencés.

Tableau 12. Résultats de l'analyse obtenus pour l'expérience avec l'ADN d'échantillons environnementaux

Numéro d'échantillon	Plante-hôte	Bactérie(s) détectée(s)	Identifications MinIon des principaux organismes* de l'échantillon	Pourcentage des reads attribués à l'organisme	Nombre de reads attribués à l'organisme
D56385	Alocasia	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Pectobacterium polaris</i>	81 %	85 115
D56386	Alocasia	<i>Dickeya</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	75 %	91 503
		<i>Pectobacterium parmentieri</i>	<i>Dickeya fangzhongdai</i>		
			<i>Dickeya dianthicola</i>	5 %	6 556
			<i>Pectobacterium carotovorum</i>	4 %	5 019
				5 %	5 895
D62640	Pomme de terre	<i>Dickeya</i>	<i>Salmonella enterica</i>	21 %	28 500
		<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	<i>Acidovorax konjaci</i>	19 %	26 897
		<i>Pectobacterium brasiliense</i>	<i>Kosakonia cowanii</i>	12 %	16 197
		<i>Pectobacterium carotovorum</i>			
		<i>Pectobacterium parmentieri</i>	<i>Enterobacter wuhouensis</i>	11 %	15 384
			<i>Pectobacterium polaris</i>		
				2%	4 057
D62199	Gingembre	<i>Dickeya</i>	<i>Dickeya fangzhongdai</i>	27 %	26 387

D54221	Laitue	<i>Pectobacterium aroidearum</i>	<i>Enterobacter wuhouensis</i>	21 %	20 749
			<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
				14 %	13 760
		<i>Pectobacterium polaris</i>	<i>Enterobacter wuhouensis</i>	55 %	51 696
D54332	Pomme de terre		<i>Pantoea dispersa</i>		
		<i>Pectobacterium polaris</i>		18 %	17 039
				8 %	7 963
		<i>Pectobacterium brasiliense</i>	<i>Dickeya dianthicola</i>	30 %	30 434
D62680	Fraisier	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Pectobacterium polaris</i>	12 %	11 935
		<i>Pectobacterium parmentieri</i>			
		<i>Xanthomonas fragariae</i>	<i>Agrobacterium vitis</i>	47 %	45 875
			<i>Pseudomonas viridiflava</i>	42 %	41 781
D62554	Laitue		<i>Xanthomonas fragariae</i>	0.8 %	788
		<i>Xanthomonas axonopodis</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	51 %	69 873
		<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	32 %	44 328
		<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	82 %	11 526
D54591	Chou-fleur	<i>Xanthomonas campestris pv. raphani</i>	<i>Pseudomonas poae</i>	20 %	8 674
			<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4 %	1 557
D56562	Géranium	<i>Xanthomonas hortorum pv. pelargonii</i>	<i>Xanthomonas hortorum pv. pelargonii</i>	87 %	75 381
D43838	Poirier	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	59 %	77 809
			<i>Pseudomonas syringae</i>	31 %	41 281
D44244	Pommier	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	33 %	5 602
			<i>Xanthomonas arboricola pv. Populi</i>	17 %	2 911
			<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
			<i>Pseudomonas syringae</i>	13 %	2 268
D58752	Poirier			10 %	1 760
		<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	99 %	131 163
		<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	100 %	204 178
		<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	96 %	136 864
D60530	Pommier	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	91 %	89 371
			<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4 %	3 747

D61553	Pomme de terre	<i>Streptomyces scabies</i>	<i>Pectobacterium polaris</i>	34 %	70 238
D62456	Bleuet	<i>Phytoplasmes de la jaunisse de l'aster</i>	<i>Ralstonia</i>	24 %	5 673
			<i>Holomonas heilongjiangensis</i>	16 %	3 712
D61492	Canneberge	<i>Phytoplasmes du flétrissement du bleuet</i>	<i>Holomonas heilongjiangensis</i>	16 %	12 543
D60778	Laitue	<i>Phytoplasmes de la jaunisse de l'aster</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	30 %	32 005
			<i>Pseudomonas fluorescens</i>	29 %	29 383

* Organismes représentant 10% et plus des reads ou concordant avec les organismes détectés

Conclusion générale et résumé des outils développés

Les pourritures bactériennes sont parmi les plus importants problèmes phytosanitaires affectant la production d'oignon. Les problèmes bactériens sont imprévisibles et peuvent occasionner des pertes au champ et lors de l'entreposage. Malgré l'importance des pertes occasionnées par les pourritures de l'oignon, le diagnostic est complexe et il n'existait pas de méthode rapide pour identifier les agents pathogènes responsables de ces pourritures. Puisqu'une multitude de microorganismes secondaires peuvent être présents sur un bulbe symptomatique, l'identification peut s'avérer longue et complexe. Au cours d'un inventaire réalisé au Québec entre 2014 et 2016 par Phytodata (AIP-P340), plusieurs espèces bactériennes ont été retrouvées dans des oignons symptomatiques (*Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea allii*, *Enterobacter cloacae*, *Rahnella aquatilis*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia gladioli* et *Burkholderia cepacia*). Certaines d'entre elles peuvent causer des symptômes seuls tandis que d'autres se retrouvent en complexe. Au cours de ce même projet, une méthode d'identification basée sur l'isolement des bactéries sur un milieu de culture semi-sélectif (Zaid, Bonasera, and Beer, 2012) couplée à l'utilisation d'un test PCR-RFLP (Bonasera, Asselin, and Beer 2014) a été évaluée. Bien que le recours au milieu semi-sélectif facilite l'isolation des bactéries, le temps de réponse reste relativement long et, dans plusieurs cas, une confirmation par séquençage est nécessaire. Ainsi, il est préférable pour réaliser un diagnostic rapide de ces maladies de pouvoir compter sur un test de détection qui permet la détection simultanée d'un minimum de 8 à 10 agents pathogènes. L'objectif de ce projet était donc de développer une méthode basée sur les nanopores pour identifier rapidement et efficacement les bactéries responsables des symptômes de la pourriture des oignons.

Pour les systèmes bactériens, l'ADN génomique extrait de souches ou directement de tissus infectés a été utilisé avec succès pour détecter et identifier les espèces présentes dans l'échantillon. Le séquençage par nanopores a effectivement permis de détecter les principales espèces de bactéries responsables de la pourriture de l'oignon autant chez les souches isolées que dans les tissus inoculés artificiellement en simplex et en duplex (postulat de Koch). L'utilisation d'ADN génomique extrait de plantes naturellement infectées a pour sa part permis de valider l'approche de détection nanopore. En effet dans la majorité des cas, le séquençage nanopore couplé au système de classification taxonomique Kraken2 ont permis d'identifier au genre et même à l'espèce les organismes responsables des symptômes présents, et ce au même titre que les méthodes d'isolement et de biologie moléculaire plus classiques (PCR-RFLP, séquençage Sanger). Les bases de données de références étant toujours en évolution, l'exactitude de l'identification ne fera que s'améliorer avec le temps.

Références

- Asselin, J. A. E., Bonasera, J. M., & Beer, S. V. (2016). PCR primers for detection of *Pantoea ananatis*, *Burkholderia* spp., and *Enterobacter* sp. from onion. *Plant Disease*, 100(4), 836-846.
- Bonasera, J. M., Asselin, J. A. E., & Beer, S. V. (2014). Identification of bacteria pathogenic to or associated with onion (*Allium cepa*) based on sequence differences in a portion of the conserved gyrase B gene. *Journal of microbiological methods*, 103, 138-143.
- Bradbury, J. F. (1970). Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *PANS Pest Articles & News Summaries*, 16(4), 632-637.
- Jacobs, J. L., Fasi, A. C., Ramette, A., Smith, J. J., Hammerschmidt, R., & Sundin, G. W. (2008). Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. *Applied and environmental microbiology*, 74(10), 3121-3129.
- Payne, A., Holmes, N., Clarke, T. et al. Readfish enables targeted nanopore sequencing of gigabase-sized genomes. *Nat Biotechnol* 39, 442–450 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-00746-x>
- Zaid, A. M., Bonasera, J. M., & Beer, S. V. (2012). OEM—A new medium for rapid isolation of onion-pathogenic and onion-associated bacteria. *Journal of microbiological methods*, 91(3), 520-526.

C. Les formes spéciales de *Fusarium oxysporum* dans les cultures maraîchères et la fraise

Fusariose de la tomate causée par *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* et f.sp. *radicis-lycopersici*

Test de pathogénicité

La pathogénicité d'un total de 14 souches de *F. oxysporum* isolées de plants de tomates a été évaluée. Seule la souche 44771 a montré des signes clairs d'infection (Figure 22). La réisolation du pathogène sur milieu de culture a également été possible pour cette souche, suivie d'une validation par PCR, confirmant le postulat de Koch.

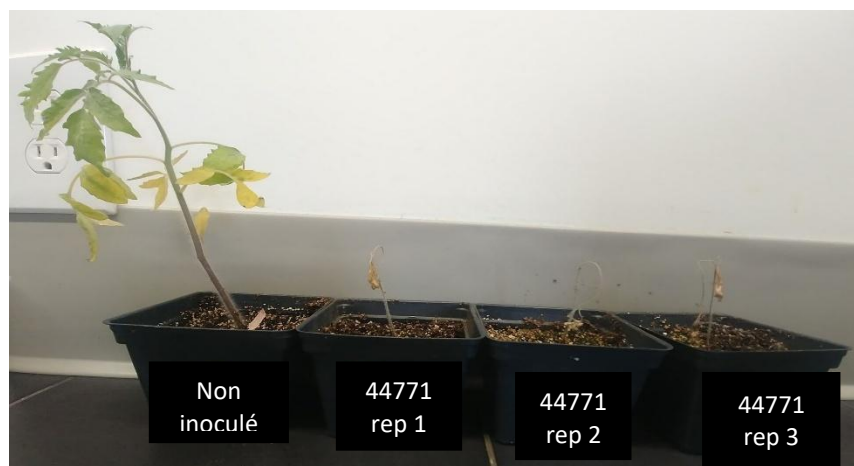


Figure 22. Pathogénicité de la souche 44771 sur des plants de tomate, comparé au témoin non inoculé.

Amplification des gènes SIX

Les 41 souches isolées de solanacées (tomates, poivrons, pomme de terre) ont été testées pour les 14 gènes SIX. La souche 44771 s'est avérée posséder tous les gènes SIX à l'exception du gène SIX 4. Les gènes SIX 1, 2, 5, 9 (G1), 10, 12, 13 et 14 amplifiés à l'aide des amorces universelles de Czislawski et al. (2021) ainsi que le SIX 3 (amorces de van der Does et al., 2008) et le SIX 8 (amorces de Meldrum et al., 2012) ont permis une identification sans ambiguïté de la forme spéciale *lycopersici* à l'aide de l'alignement des séquences obtenues. De plus, comme le gène SIX 4 n'a pas été amplifié, la possibilité que la souche appartienne à la race 1 a été écartée. Le séquençage suivi de l'alignement du gène SIX 3 avec la base de données a permis de conclure que la souche 44771 fait partie de la race 3. Les gènes SIX 6, 7 et 11 ont également été amplifiés pour la souche 44771, cependant l'alignement des séquences obtenues après l'amplification à l'aide des amorces de

Czsilowski avec la base de données indiquait une ambiguïté avec les formes spéciales *phaseoli* (SIX 6 et 11), *physali* (SIX 7) et *spinaciae* isolat Fus004 (MK906677) (SIX11) puisque leurs séquences étaient similaires à celle de *lycopersici*. L'amplification des gènes SIX 6, 7 et 11 à l'aide des amorces de Lievens et al. (2009) ou Taylor et al. (2016) n'a pas été testée.

D'autres souches isolées de solanacées posséderaient également certains gènes SIX. Le gène SIX 2 a amplifié pour les souches 1391.01 et 1429.05 isolées du poivron, avec une séquence identique à *lycopersici*. Le gène SIX 9 (amorces G1) a également été amplifié pour la souche 1391.03, aussi isolée du poivron, avec une séquence presque identique (1 SNP) à celle de *cubense*. Le gène SIX 9 (amorces G2) a été amplifié pour les souches 1420.03 et 1420.02, toutes deux isolées de la pomme de terre, avec une séquence similaire à 91% avec celle de *lycopersici*. Enfin, le gène SIX 14 a amplifié pour la souche 1391.02 isolée du poivron, avec une séquence différente des autres séquences disponibles sur NCBI.

Suite aux résultats obtenus, l'utilisation des amorces de van der Does et al. (2008) pour l'amplification du gène SIX 3, ainsi qu'un séquençage SANGER du produit PCR obtenu, seraient efficace pour d'une part, confirmer la forme spéciale *lycopersici*, et d'une autre part différencier la race 3 des races 1 et 2 par alignement des séquences. Dans l'éventualité que la race 1/2 (non différenciable) soit obtenue, une amplification du gène SIX 4 réalisée à l'aide des amorces de Czisowski et al. (2021) ou de celles de Lievens et al. (2009) permettrait de différencier entre ces deux races puisque seulement la race 1 possède le gène SIX 4.

L'amplification et le séquençage de plusieurs SIX serait tout de même à privilégier puisque le nombre de séquences de références de d'autres formes spéciales reste très limité. De plus, certains gènes homologues peuvent être observés chez des isolats non pathogènes ou dont la forme spéciale n'a pas été identifiée. Par exemple, dans la collection du projet, le gène SIX 2 a été amplifié pour 6 souches isolées de cultures différentes (2 de poivrons, 2 de laitues, 1 d'épinard et 1 de bleuet), et leur séquence est identique à celle de *lycopersici*. Ces souches ne possèdent toutefois pas d'autres gènes SIX, confirmant que ce ne sont pas des formes spéciales *lycopersici*.

Pourriture basale fusarienne causée par *F. oxysporum* f.sp. *cepae*

Tests de pathogénicité

La pathogénicité de 62 souches de *F. oxysporum* isolées d'oignons, d'échalotes françaises ou d'ail a été évaluée. Au total, 10 souches n'ont provoqué aucun symptôme, 13 souches ont provoqué une

sévérité faible, 12 souches ont provoqué une sévérité intermédiaire et 27 souches ont provoqué une sévérité élevée (Tableau 13). Une ré-isolation de la souche ATCC62592 et sa confirmation par PCR a été possible, confirmant le postulat de Koch.

Effecteur C5 et gènes SIX (secreted in xylem)

Le tableau 13 présente le résultat des essais de pathogénicité en parallèle avec les tests PCR réalisés sur chacune des souches. Les cases noires indiquent une amplification. Les gènes SIX 1 à 13 ont tous été alignés aux séquences de référence et sont similaires à *cepae* lorsque les cases sont noires ou sont similaires à une autre forme spéciale lorsque les cases sont grises. La confirmation par alignement de la forme spéciale *cepae* pour le gène SIX 14 a été réalisée pour quelques souches, dont la souche ATCC62592.

De manière générale, les souches les plus virulentes (sévérité élevée) sont également celles qui possèdent l'effecteur C5, à l'exception de la souche 1287.02. À quelques exceptions près, ces souches possèdent également les gènes SIX 3, 5, 7, 9, 10, 12 et 14. Ces résultats concordent parfaitement avec les résultats obtenus par Taylor et al. (2016). Certaines souches des catégories nul, faible ou intermédiaire peuvent posséder les gènes 2, 8, 9(G1) ou 14, mais jamais les gènes SIX 3, 5, 7, 10 ou 12. Selon les résultats obtenus, les gènes SIX 3, 5, 7, 10 et 12 ainsi que l'effecteur C5 seraient probablement plus liés à la pathogénicité de *F. oxysporum* f.sp. *cepae* que les gènes SIX 9 ou 14. Cette observation concorde également avec la littérature, le gène SIX 9 étant connu pour être présent dans des isolats de *Fusarium oxysporum* isolés d'oignon, mais non pathogène (Armitage et al., 2018). Aucun patron clair n'a été observé pour les souches ayant induit une sévérité intermédiaire. Un gène ou un mécanisme différent serait donc possiblement impliqué dans la pathogénicité pour ces souches.

Utilisation des gènes SIX et de l'effecteur C5 dans un contexte de diagnostic.

Selon les résultats obtenus, il serait possible d'identifier la forme spéciale *cepae* à l'aide de l'effecteur C5. L'utilisation des gènes SIX 3, 5, 7, 10 ou 12, ou une combinaison de ces gènes est également possible à condition de valider par séquençage.

Tableau 13. Nom de la souche, culture de provenance, sévérité et résultat des tests PCR et du séquençage SANGER réalisés pour l'effecteur C5 et les gènes SIX 1 à SIX 14 sur les souches provenant d'allium

[illegible]

594.7	Échalote	Sévère															
815.14	Échalote	Sévère															
815.05	Échalote	Sévère															
1396.01	Échalote	Sévère															
1397.01	Échalote	Sévère															
1398.01	Échalote	Sévère															
1398.02	Échalote	Sévère															
1399.01	Échalote	Sévère															
1400.04	Échalote	Sévère															
4242	Oignon	Sévère															
4244	Oignon	Sévère															
1114.01A	Oignon	Sévère															
1114.01B	Oignon	Sévère															
1115.02	Oignon	Sévère															
1120.02	Oignon	Sévère															
1150.02	Échalote	Sévère															
1154.01	Échalote	Sévère															
1175.02	Échalote	Sévère															
U1271	Oignon	Sévère															
U1272	Oignon	Sévère															
U240	Oignon	Sévère															
U244	Oignon	Sévère															ND
1401.01	Échalote	Sévère															
1287.02	Échalote	Sévère															
U93	Oignon	Sévère															
U256	Oignon	Sévère															ND

Les cases noires indiquent une amplification et les cases blanches, aucune amplification. Les gènes SIX 1 à 13 ont tous été alignés aux séquences de référence et sont similaires à *cepae* lorsque les cases sont noires ou sont similaire à une autre forme spéciale lorsque les cases sont grises. Une validation par séquençage a été effectuée pour quelques souches pour le gène SIX 14. ND : résultat non disponible.

Flétrissement fusarien de l'épinard causé par *F. oxysporum* f.sp. *spinaciae*

Test de pathogénicité

Un total de 45 différents isolats, incluant la souche ATCC90152 de *F. oxysporum* f.sp. *spinaciae*, ont été testés pour leur caractère pathogène sur l'épinard. La souche ATCC90152 s'est avérée provoquer des symptômes de flétrissement clairs ainsi qu'une pourriture sévère du système racinaire. Cette souche était utilisée comme témoin à chaque expérience. Dans 6 des 7 expériences, 90-100% des plants semés et inoculés avec la souche ATCC90152 étaient atteints de flétrissement et leur système racinaire fortement atteint (Figure 23). Dans la 2ième expérience, 50% des plants ont été atteints. Cette souche était la seule à provoquer des symptômes aussi sévères sur l'épinard.

L'agent pathogène a pu être ré-isolé à partir des tissus affectés, confirmant le postulat de Koch. Certaines autres souches semblent avoir été en mesure de provoquer des symptômes, surtout au niveau racinaire, où les racines présentaient une décoloration foncée. Cependant, les symptômes observés ont toujours été beaucoup moins sévères que pour la souche ATCC90152. Dans certains cas, un léger flétrissement de la partie aérienne ou encore la pourriture des cotylédons à l'intérieur du tégument après l'émergence a également pu être observé. Pour chaque réplica et pour chaque souche testée, un pourcentage de plants présentant des symptômes a pu être calculé. La moyenne de ce pourcentage a ensuite été utilisée pour catégoriser le niveau de sévérité en quatre catégories, soit nul (0%), faible (1 à 24%), intermédiaire (25 à 50%) et élevé (51% et plus). À noter que des souches se situent dans la même catégorie que la souche ATCC90152 étant donné leur pourcentage de plants atteints, cependant un flétrissement menant à la mort des plants n'a été constaté que pour la souche ATCC90152 (Tableau 14).

Tableau 14. Résultat des essais de pathogénicité des souches isolées de l'épinard.

Essai	Souche	Cote	Moyenne du pourcentage de plants affectés
1	772.1	Nul	0
1	Témoin non inoculé	Nul	0
1	748.P13.03	Faible	25
1	772.12B	Faible	8
1	738.05	Intermédiaire	35
1	740.07	Intermédiaire	33
1	702.08A	Intermédiaire	31
1	ATCC 90152	Élevé	91
2	734.7	Nul	0
2	772.16	Nul	0
2	Témoin non inoculé	Nul	0
2	U194	Nul	0
2	641.1	Faible	10
2	703.4	Faible	8
2	734.4	Faible	13
2	749 P25.8	Faible	17
2	ATCC 90152	Élevé	52
3	749 P22.6	Faible	10
3	772.12A	Faible	19
3	Témoin non inoculé	Faible	6
3	741.07	Intermédiaire	34
3	772.16	Intermédiaire	33
3	963.01	Intermédiaire	26
3	43631	Intermédiaire	32

3	ATCC90152	Élevé	100
4	Témoin non inoculé	Nul	0
4	734.03	Faible	25
4	959	Faible	6
4	772.14B	Faible	9
4	ATCC90152	Élevé	100
5	738.07	Nul	0
5	Témoin non inoculé	Faible	2
5	711.3	Intermédiaire	39
5	736.05	Élevé	76
5	739.4	Élevé	69
5	772.17	Élevé	82
5	940	Élevé	85
5	701.1A	Élevé	51
5	ATCC90152	Élevé	100
6	Témoin non inoculé	Faible	11
6	U193	Faible	25
6	451.3	Intermédiaire	35
6	702.07	Intermédiaire	26
6	740.08	Intermédiaire	32
6	1124	Intermédiaire	26
6	749.P25.09	Intermédiaire	26
6	702.05	Élevé	55
6	772.14	Élevé	62
6	ATCC 90152	Élevé	98
7	Témoin non inoculé	Nul	0
7	703.04	Faible	9
7	880	Faible	2
7	1017.02	Faible	14
7	1147	Faible	9
7	1402.01	Faible	2
7	1402.02	Faible	6
7	1382.01	Intermédiaire	26
7	ATCC90152	Élevé	100

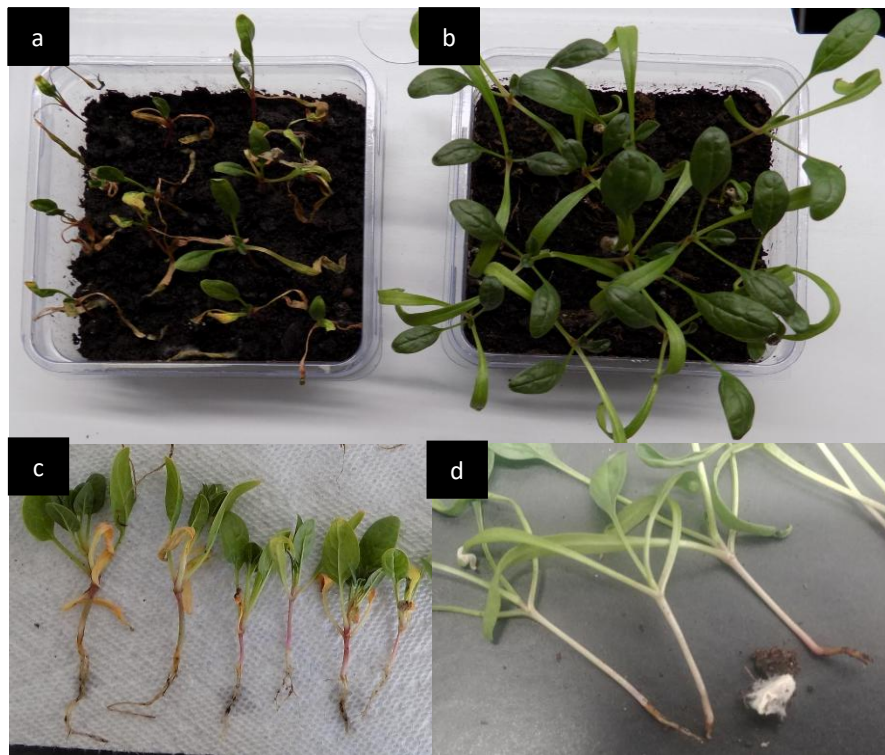


Figure 23. a) Symptômes aériens induits par la souche ATCC90152 b) Témoin non inoculé c) Symptômes racinaires induits par la souche ATCC90152 d) Symptômes racinaires induits par la souche 703.4

Gènes SIX (secreted in xylem)

Au total, 49 souches isolées de l'épinard ont été testées pour les 14 gènes SIX en utilisant les amorces décrites par Czislawski et al. (2021). La souche ATCC90152 s'est avérée posséder les gènes SIX 4, 8 et 14. Ces trois gènes SIX sont les seuls connus pour être présents chez la forme spéciale *spinaciae*. Cependant, aucune séquence pour les gènes SIX 4 et 8 pour f.sp *spinaciae* n'est disponible sur GenBank. La forme spéciale *spinaciae* a donc pu être confirmée par alignement seulement pour le gène SIX 14. Aucune autre souche isolée de l'épinard ne s'est avérée posséder ces trois gènes SIX. Certains SIX ont cependant été amplifiés chez certaines souches. Le gène SIX 2 a été trouvé chez les souches 1402.02, 959 et 1124 (séquence de 1124 identique à *lycopersici*), et le gène SIX 9 (groupe 1) a également été trouvé pour 12 souches.

PCR en temps réel spécifique à F. oxysporum f.sp. spinaciae

Une PCR en temps réel conçue sur le gène effecteur Fos1_2 a été développée et publiée en 2023 par A. Batson et son équipe (Batson et al., 2023). Ce test permettrait de détecter et de quantifier les deux races de *F. oxysporum* f.sp. *spinaciae* tout en étant très spécifique. L'évaluation de ce test

qPCR a été réalisée dans le cadre du projet. Sur les 49 extraits d'ADN d'organismes inclus dans l'évaluation de la spécificité du test, aucun n'a été amplifié excepté la souche ATCC90152 de *F. oxysporum* f.sp. *spinaciae* (voir tableau 15). La totalité des souches de *F. oxysporum* isolées de l'épinard ont également été testées avec le test qPCR. Aucune amplification n'a été obtenue.

Utilisation des tests dans un contexte de diagnostic.

Selon les résultats obtenus, il ne semble qu'aucune des souches isolées de l'épinard dans le cadre du projet ne correspondent à la forme spéciale *spinaciae*, à l'exception de la souche de référence ATCC90152. Bien que certaines souches aient provoqué certains dommages, ces souches ne possèdent ni les gènes SIX 4, 8, ou 14, ni l'effecteur Fos1 ou 2. Bien que la forme spéciale *spinaciae* semble être souvent observée en Ontario (McDonald et al., 2021), sa présence au Québec reste encore à confirmer.

Afin de détecter la forme spéciale *spinaciae* rapidement et efficacement, il est possible d'utiliser le test de PCR en temps réel développé par Batson et al. (2023). D'une manière générale, les systèmes de PCR en temps réel sont mieux adaptés pour traiter les échantillons environnementaux (végétaux et sol) que le PCR classique. Également, une PCR classique amplifiant le gène SIX 14 peut être réalisée avec les amorces de Czislawski et al. (2021). Un séquençage suivi de l'alignement de la séquence obtenue sont cependant nécessaires pour confirmer la forme spéciale.

Tableau 15 : Résultats de l'évaluation de la spécificité du test PCR en temps réel de Batson et al. (2023) ciblant *Fusarium oxysporum* f.sp. *spinaciae*.

Souche	Nom de l'organisme	Culture de provenance	Valeur de Cq
1458.02	<i>Alternaria alternata</i>	Épinard	.
1415.01	<i>Cladosporium</i> sp.	Brocoli	.
1415.02	<i>Cladosporium</i> sp.	Brocoli	.
553.4	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Fraise	.
U1602	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Patate	.
1370.04	<i>Didymella</i> sp.	Brocoli	.
729.11	<i>Epicoccum nigrum</i>	Carotte	.
1348.02	<i>Epicoccum nigrum</i>	Épinard	.
U19A	<i>Fusarium acuminatum</i>	Laitue	.
U1119	<i>Fusarium armeniacum</i>	Carotte	.
U1190	<i>Fusarium armeniacum</i>	Carotte	.
962.01	<i>Fusarium armeniacum</i>	Épinard	.
641.4b	<i>Fusarium commune</i>	Épinard	.
1424.01	<i>Fusarium commune</i>	Fraise	.
1424.02	<i>Fusarium commune</i>	Fraise	.
662.15	<i>Fusarium equiseti</i>	Laitue	.
998.03	<i>Fusarium equiseti</i>	Concombre	.
972.2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Épinard	.
1124	<i>Fusarium oxysporum</i>	Épinard	.

309.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	Ail	.
451.3	<i>Fusarium oxysporum</i>	Épinard	.
711.03	<i>Fusarium oxysporum</i>	Épinard	.
734.7	<i>Fusarium oxysporum</i>	Épinard	.
736.5	<i>Fusarium oxysporum</i>	Épinard	.
667.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	Laitue	.
619.4A	<i>Fusarium oxysporum</i>	Betterave	.
619.4B	<i>Fusarium oxysporum</i>	Betterave	.
40356	<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomate	.
681.11	<i>Fusarium oxysporum</i>	Brocoli	.
1115.02	<i>Fusarium oxysporum</i>	Oignon	.
1396.01	<i>Fusarium oxysporum</i>	Échalote	.
ATCC 90152	<i>Fusarium oxysporum f.sp. spinaciae</i>	Épinard	20.8
ATCC62592	<i>Fusarium oxysporum f.sp. cepae</i>	Oignon	.
1427.02	<i>Fusarium oxysporum f.sp. radicle-cucumerinum</i>	Concombre	.
53455	<i>Fusarium oxysporum f.sp. fragariae</i>	Fraise	.
46223	<i>Fusarium oxysporum f.sp. fragariae</i>	Fraise	.
44771	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici race 3</i>	Tomate	.
ATCC MYA-3040	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lactucae race 1</i>	Laitue	.
U271	<i>Fusarium oxysporum f.sp. apii (à valider)</i>	Céleri	.
U594	<i>Fusarium proliferatum</i>	Ail	.
U595A	<i>Fusarium proliferatum</i>	Ail	.
U595B	<i>Fusarium proliferatum</i>	Ail	.
1390.02	<i>Fusarium solani</i>	Poivron	.
1501.02	<i>Fusarium solani</i>	Céleri	.
1502.01	<i>Fusarium solani</i>	Céleri	.
354.04	<i>Pythium ultimum</i>	Épinard	.
1363.02	<i>Rhizoctonia solani</i>	Laitue	.
1492.01	<i>Stemphylium vesicarium</i>	Chou-fleur	.

Pourriture fusarienne de la tige et des racines du concombre causée par *Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum*, *f.sp. radicle-cucumerinum* et occasionnellement causée par *f.sp. melonis*

Tests de pathogénicité

Un total de 9 souches de *F. oxysporum* isolées du concombre (6), du melon (1) ou du cantaloup (2) ont été testées pour leur caractère pathogène sur des plants de concombre. Les souches 1427.02 et 1427.03, isolées de racines de concombres en serre, ont provoqué des symptômes clairs de flétrissement vasculaire pour deux des trois répliques ainsi que des nécroses sévères au niveau du système racinaire pour les trois répliques des deux souches (Figure 24). Les autres souches, ainsi que le témoin non inoculé, n'ont montré aucun symptôme.

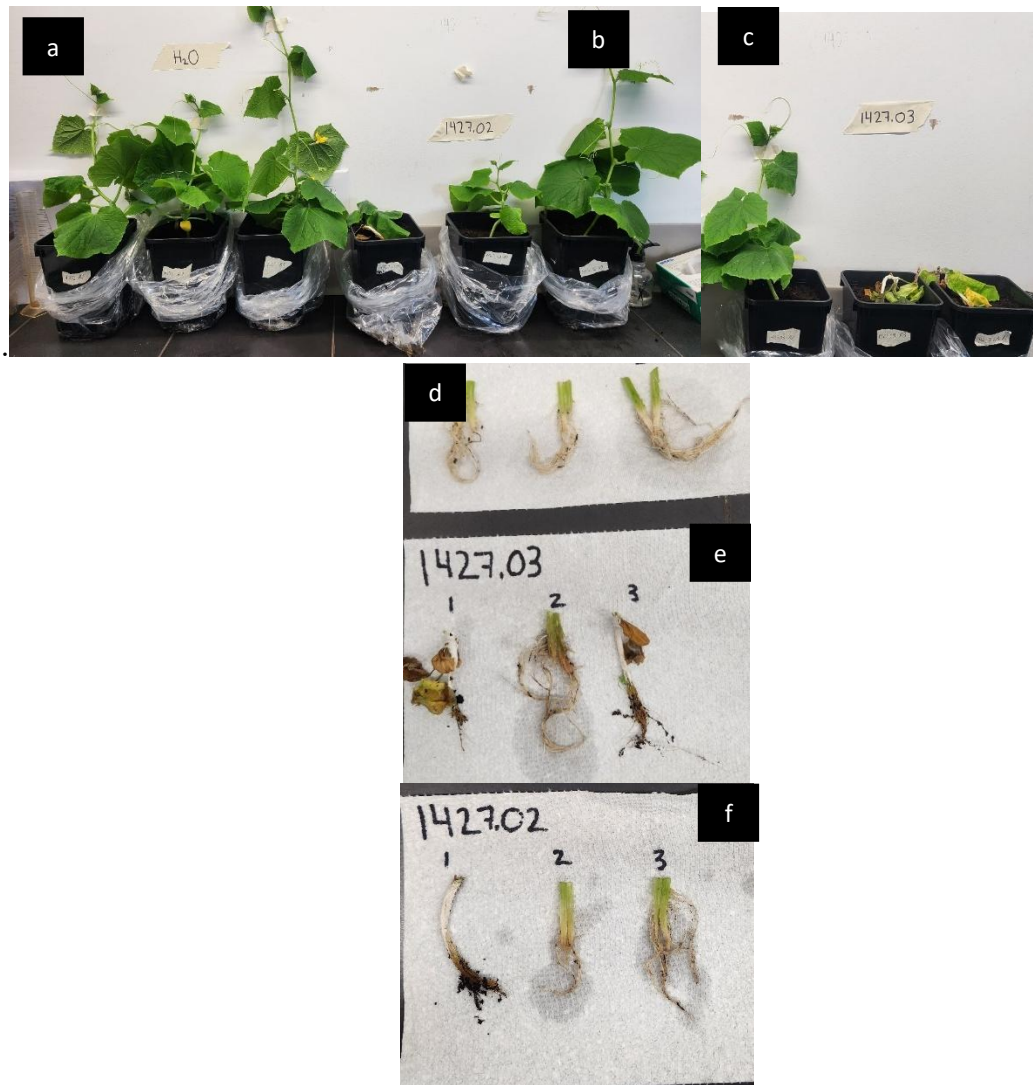


Figure 24. A. Plant de concombres non-inoculés (trois premiers plants). B) Plants de concombres inoculés avec la souche 1427.02. C) Plants de concombres inoculés avec la souche 1427.03. D) Racine des plants de concombres non-inoculés. E) Racines des plants de concombres inoculés avec la souche 1427.03 F) Racines des plants de concombres inoculés avec la souche 1427.02

Effecteur et gènes SIX (secreted in xylem)

Les 9 souches isolées de cucurbitacées ont été testées avec les amorces spécifiques aux formes spéciales des cucurbitacées (fp7304-fp7321) et spécifiques à la forme spéciale *radicis-cucumerinum* (fp7305-fp7322) développées par van Dam et al. (2018). Les 9 souches ont également été testées pour les 14 gènes SIX à l'aide des amorces développées par Czislawski et al. (2021). Les souches pathogènes 1427.02 et 1427.03 se sont avérées posséder les gènes SIX 6 et SIX 13. Les séquences du gène SIX 6 obtenues sont identiques aux séquences de référence pour *melonis*, *niveum* et *radicis-cucumerinum* (indistinguable), mais différentes de *cucumerinum*. Les séquences du gène SIX 13 obtenues sont identiques aux séquences de référence pour *radicis-cucumerinum*,

mais différentes de *niveum* (aucune mention de ce gène pour *cucumerinum* et *melonis*). Aucune autre des souches testées ne possède de gène SIX à l'exception de la souche 26336 isolée du melon, pour qui le gène SIX 9 (G1) a été trouvé. De plus, les souches 1427.03 et 1427.04 se sont également avérées être positives pour les deux PCR spécifiques, alors que les autres souches sont négatives.

Selon les résultats obtenus, les souches 1427.03 et 1427.02 appartiendraient plus probablement à la forme spéciale *radicis-cucumerinum*. Les amorces HPEG spécifiques aux formes spéciales affectant les cucurbitacées (i.e. *cucumerinum*, *radicis-cucumerinum*, *niveum* et *melonis*) pourraient donc être utilisées en premier lieu pour écarter la possibilité d'une infection par un autre pathogène ou une autre forme spéciale de *F. oxysporum* dans un cucurbitacée infecté (à noter que le test a été validé seulement pour f.sp *radicis-cucumerinum*). Par la suite, un diagnostic plus précis peut être effectué en amplifiant les gènes SIX 6 et SIX 13, puis en effectuant un séquençage et un alignement des séquences obtenues. D'autres paires d'amorces également développées par Van Dam et al. (2018) et qui seraient spécifiques à *cucumerinum*, *melonis*, et *niveum* pourraient également être utilisées mais n'ont pas été évaluées dans le cadre du projet.

Fusariose de la laitue causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*

Généralité

À ce jour, seule la race 1 de *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (FOL) a été identifiée en Amérique du Nord et du Sud (Paugh et Gordon 2020). Aucun cas de FOL race 1 n'a été répertorié pour le moment au Canada. Pour ce qui est de la race 4, elle a été identifiée par Gilardi et al. (2017) aux Pays-Bas et est maintenant présente en Belgique (Claerbout et al., 2018), en Irlande et en Angleterre (Taylor et al., 2019), en Italie (Gilardi et al., 2019) et en Espagne (Gálvez et al., 2023). Les formes spéciales FOL race 2 et 3 ont pour leur part seulement été signalées au Japon et à Taiwan (Fujinaga et al., 2001 ; Fujinaga et al., 2003 ; Lin et al., 2014). Des amorces de PCR conventionnelle spécifiques aux races 1 et 4 ont été développées (Pasquali et al., 2007; Gilardi et al., 2017). Ces deux tests moléculaires spécifiques ont été largement utilisés par d'autres équipes et leur efficacité a été démontrée. L'équipe de Fujinaga et al. (2014) a tenté de développer des tests PCR conventionnels pour les races 2 et 3. Cependant, les résultats obtenus par notre équipe montraient beaucoup d'amplifications non spécifiques, rendant ces tests non utilisables. En effet, plusieurs souches isolées de la laitue se sont avérées être positives pour les deux races, avec un fragment de la bonne taille mais pour aucune souche l'alignement de la séquence ne correspondait à la séquence de référence. De plus, selon Gilardi et al. (2017), plusieurs faux positifs sont obtenus pour ces tests

PCR de race 2 et 3. À l'heure actuelle, il n'existe donc aucun test moléculaire spécifique fiable pour les FOL races 2 et 3.

Essais de pathogénicité de FOL race 1 sur le cultivar New Red Fire

Un total de 17 souches de *F. oxysporum* isolées de la laitue (incluant ATCCmya3040) ont été inoculées sur des laitues cv. New Red Fire, dans trois essais distincts. Dans le premier essai, la plupart des souches ont montré une légère décoloration du système racinaire, alors que le témoin non traité n'a montré aucun symptôme. La souche ATCCmya3040 a quant à elle provoqué des symptômes sévères au niveau du xylème. Dans les deux autres essais, aucun isolat n'a montré de symptôme (Tableau 16).

À l'exception de la souche témoin ATCCmya3040, les résultats obtenus sont discordants de ceux obtenus dans les amplifications PCR, puisque seul l'isolat 666.01 a été amplifié par les amorces spécifiques à la race 1, alors que cet isolat ne semble pas être en mesure d'infecter une laitue d'un cultivar sensible. De plus, les isolats qui semblaient avoir provoqué des signes d'infection chez le cultivar sensible à la race 1 ne sont pas positifs avec les amorces spécifiques de la race 1.

Tableau 16. Résultats des tests de pathogénicité des 17 souches testées sur le cultivar New Red Fire.

Essai	Isolat	Cote de sévérité globale
1	MYA3040	12
1	618.2	6
1	668.12	5
1	714.8	5
1	723.1	2
1	107.2B	4
1	357P12.1A	4
1	722B1	1
1	U1108	3
1	Non traité	0
2	MYA3040	6
2	688.04	0
2	713.05	0
2	779.7	0
2	942.05	0
2	946.01	0
2	948.03	0
2	Non traité	0

3	MYA3040	12
3	665.03	0
3	666.01	0
3	Non traité	0

F.oxysporum f.sp lactucae (FOL) race 1

Puisque seule la race 1 de *Fusarium oxysporum f. sp. lactucae* a été détectée en Amérique, les amorces PCR spécifiques à cette race et développées par Pasquali et al. (2007) ont été évaluées dans ce projet. Ces amorces ont été conçues à partir d'une bande spécifique (2337 bp), obtenue à partir de l'inter-retrotransposon *sequence-characterized amplified regions* (IRAP-SCAR) technique de la région LTR du rétrotransposon Han solo-LTR. Le test PCR utilisant la paire d'amorces Hani3' et Hanilatt3rev servant à amplifier un fragment spécifique de 183 paires de base a donc été optimisé en utilisant la souche de référence ATCCMya-3040 de *F.oxysporum f.sp lactucae* R1.

La totalité des souches de *F. oxysporum* isolées de la laitue, ainsi que les souches de formes spéciales disponibles dans la collection (*cepae, spinaciae, radicis-cucumerinum, lycopersici et fragariae*), ont été testées avec la paire d'amorces. De ce lot, deux souches ont été amplifiées, soit la souche de référence ATCCMya-3040 et l'isolat 666.01. Une validation par PCR-Séquençage à l'aide des amorces Hani a été effectuée pour les deux souches. Les séquences obtenues ont par la suite été alignées avec la séquence de référence (DQ208164.1) à l'aide du logiciel Geneious prime. Les séquences obtenues pour ces souches sont identiques à la séquence de référence.

F.oxysporum f.sp lactucae (FOL) race 4

FOL race 4 n'a jamais été répertorié en Amérique, toutefois, les amorces FUPF et FUPR développées par Gilardi et al. (2017) ont tout de même été évaluées. L'amplification PCR résulte en un fragment spécifique d'une longueur de 250 paires de base. Le principe de conception des amorces (IRAP-SCAR) est le même que pour les amorces Hani3' et Hanilatt3rev développées par Pasquali et al. (2007).

Un total de 92 souches de *F. oxysporum* dont 82 isolées de la laitue, 6 formes spéciales (*lactucae* race 1, *cepae, spinaciae, radicis-cucumerinum, lycopersici et fragariae*) et 4 autres *F. oxysporum* provenant de diverses cultures ont été testées avec les amorces spécifiques à FOL race 4. Seule la souche U271 isolée du céleri s'est avérée être positive. Étrangement, cet isolat est également positif pour le test PCR spécifique de *F. oxysporum f.sp. apii* race 2. Puisqu'aucune séquence de référence

n'est disponible dans NCBI ni pour ce gène ni pour FOL race 4, nous n'avons pas été en mesure d'aller plus loin dans l'optimisation du test. Les séquences des amorces, ainsi que la température d'hybridation utilisée pour l'évaluation du test sont disponibles dans le tableau 17.

Tableau 17. Nom des amorces, direction, séquence et température d'hybridation pour le test PCR spécifique à *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* race 4.

Nom de l'amorce / direction	Séquence 5' – 3'	Température d'hybridation
FUPF	GGAACCAACCGTCACAATAAC	60.6°C
FUPR	GTCGTAACACTAACTCGCTT	

PCR en temps réel pour l'identification de FOL race 1 et 4

Un test PCR en temps réel pour l'identification des races 1 et 4 de *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* a été publié en novembre 2023 par une équipe de Belgique (Mestdagh et al., 2023). Ce test est effectué en duplex pour chaque race (deux paires d'amorces et deux sondes par race). Nous n'avons pas été en mesure d'évaluer ces tests, mais comme ils ont été optimisés autant dans les sols que dans les tissus infectés, l'option de la PCR en temps réel s'avère intéressante dans un contexte de diagnostic.

PCR-RFLP pour la différenciation de FOL races 1,2,3, et 4.

Gilardi et al. (2017) proposent une technique de PCR-RFLP sur le gène IGS en utilisant les amorces CNL12 et CNS1. Selon les auteurs, la longueur de 2,6 kb du fragment amplifié à l'aide de ces amorces augmenterait la possibilité d'obtenir des profils de digestion différents. Dans cet article, en utilisant les sites de restriction spécifiques AatII et AluI, divers profils de digestion ont été associés aux quatre races pathogènes de FOL.

Puisque nous n'avons pas d'ADN de référence pour les quatre races, nous avons vérifié théoriquement l'utilisation de cet outil à l'aide d'alignements de séquences de référence obtenues à partir de la base de données NCBI. Les quatre races de FOL, ainsi que les formes spéciales : *opuntiarum*, *raphani*, *cubense*, *radicis*, *callistephi*, *vasinfectum*, *asparagi*, *phaseoli*, *rhois*, *matthiolae*, *spinaciae*, *dianthi*, *gladioli*, *tulipae*, *conglutinans*, *cepae*, *medicaginis*, *fabae* et *heliotropii* ont été incluses dans l'alignement. Nous n'avons pas inclus toutes les formes spéciales puisque les séquences IGS disponibles sur NCBI étaient trop courtes ou qu'il n'y avait tout simplement pas de séquence disponible. En observant les profils théoriques de digestion, l'enzyme de restriction AatII permet de distinguer des patrons de digestion différents pour les races 2 et 3. Cependant, les races 1 et 4 possèdent le même patron de digestion partagé avec certaines autres formes spéciales. Il serait donc possible d'utiliser cette enzyme de restriction dans la mesure où

l'identification des races 2 ou 3 est visée, puisque des tests spécifiques pour les races 1 et 4 sont déjà existants. L'alignement de la figure 25 donne un aperçu visuel des patrons de digestion pour les races 1 à 4, ainsi que pour les autres formes spéciales testées. Une seconde digestion avec l'enzyme de restriction *AluI* permet quant à elle de différencier les 4 races de *lactucae*, ainsi que toutes les formes spéciales du complexe *Fusarium oxysporum* testées dans cet alignement. Cependant, le nombre de sites de restriction que contient chacune des séquences IGS rend le travail d'analyse long et fastidieux. L'option d'utiliser le PCR-RFLP avec l'enzyme *AatII* devrait selon nous seulement être envisagée lorsque les PCR spécifiques pour les races 1 et 4 sont négatifs et que l'identification des isolats pour les races 2 ou 3 est souhaitée. Le tableau 18 donne un bref résumé des identifications possibles à l'aide des enzymes de restriction *AatII* et *AluI*.

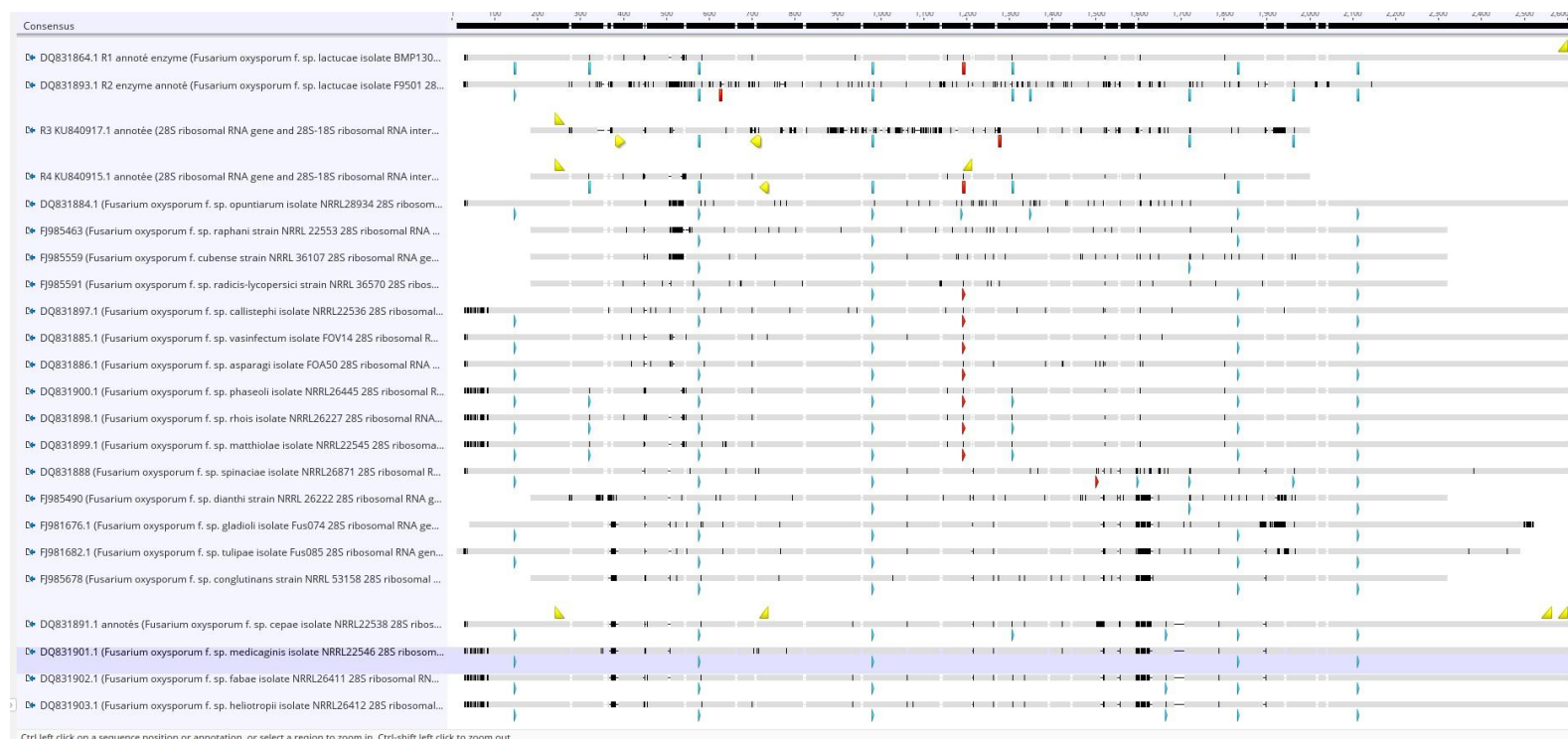


Figure 25. Alignement des 4 races de FOL et d'autres formes spéciales du complexe *Fusarium oxysporum*. Dans l'ordre, FOL race 1, FOL race 2, FOL race 3, FOL race 4 ainsi que les formes spéciales *opuntiarum*, *raphani*, *cubense*, *radialis*, *callistephi*, *vasinfectum*, *asparagi*, *phaseoli*, *rhois*, *matthiolae*, *spinaciae*, *dianthi*, *gladioli*, *tulipae*, *conglutinans*, *cepae*, *medicaginis*, *fabae* et *heliotropii*

Tableau 18. Résumé des identifications possibles de formes spéciales à l'aide des enzymes de restriction AatII et AluI

Formes spéciales	AatII	AluI
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lactucae R1</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lactucae R2</i>	Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lactucae R3</i>	Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lactucae R4</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. opuntiarum</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. raphani</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. radialis</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. callistephi</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. asparagi</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. rhois</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. matthiolae</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. spinaciae</i>	Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. dianthi</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. gladioli</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. tulipae</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. cepae</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. medicaginis</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. fabae</i>	Non Distinguishable	Distinguishable
<i>Fusarium oxysporum f. sp. heliotropii</i>	Non Distinguishable	Distinguishable

Jaunisse fusarienne du céleri causé par *Fusarium oxysporum f.sp. apii*

Tests de pathogénicité

Des essais de pathogénicité ont été réalisés sur un total de 12 souches de *F. oxysporum* isolées de céleri. Aucune des souches testées n'a semblé induire des symptômes sur le céleri. Les tests de pathogénicité ont été réalisés en conditions non contrôlées (bacs à l'extérieur) sur un cultivar non connu. Une validation de la souche U271 (positive pour la PCR race 2) sur un autre cultivar et dans de meilleures conditions d'infection est nécessaire afin de valider l'identification de la souche, et par le fait même valider l'utilisation des amorces pour la race 2.

*Tests PCR visant les races 2 ou 4 de *F. oxysporum f.sp. apii**

Les amorces spécifiques aux races 2 et 4 développées par Epstein et al. (2017) sont les seules amorces spécifiques publiées à ce jour. Un total de 13 souches de *F. oxysporum* isolées du céleri ont été testées pour les deux paires d'amorces. Seulement l'isolat U271 s'est avéré être positif pour

la race 2. Étrangement, cet isolat est également positif pour la PCR visant la race 4 de *F. oxysporum* f.sp. *lactucae*.

Gènes SIX

À ce jour, le gène SIX 1 (région orthologue) a été observé pour les races 2, 3 et 4 de *F. oxysporum* f.sp. *apii* (Henry et al., 2020, additional file 17). Seule la séquence de la race 4 est disponible sur GenBank (numéro d'accèsion MT364398).

Toutes les souches isolées du céleri ont été testées pour les 14 gènes SIX à l'aide des amorces développées par Czislowski et al. (2021). Les amorces de van der Does (2008) pour le gène SIX 1 ont également été testées.

Les gènes SIX 1 et SIX 9 (groupe 2) ont amplifié pour la souche U271. Cependant, la séquence obtenue pour le gène SIX 1 n'est pas similaire à la séquence de référence pour la race 4. Comme aucune séquence du gène SIX 1 n'est disponible pour la race 1, il est difficile de conclure l'identification de la souche U271, et par le fait même les méthodes d'identification par PCR.

Fusariose de la fraise causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae*

Tests de pathogénicité

Un test de pathogénicité a été effectué sur les souches 53455 et 46223 isolées de la fraise et positives pour le test PCR spécifique à la forme spéciale *fragariae* développé par Suga et al. (2013). Les deux souches ont provoqué des symptômes sévères de flétrissement, menant jusqu'à la mort du plant pour deux des trois répliques pour la souche 46223 et pour les trois répliques pour la souche 53455 (voir figure 26). Le test PCR effectué sur les tissus affectés était également positif pour les deux souches.



Figure 26. Résultats des essais de pathogénicité effectués sur le cultivar de fraise Ruby Ann. À gauche : les témoins non inoculés, en haut à droite : la souche 46223, en bas à droite : la souche 53455.

Gènes SIX et test PCR spécifique à f.sp. fragariae développé par Suga et al. (2013)

Un total de 10 souches isolées de fraises, ainsi que les f.sp. *cepaе*, *lactucae* R1, *radiciscucumerinum*, *spinaciae* et *lycopersici* ont été testées avec les amorces fofra spécifiques à f.sp. *fragariae*. Seules les souches 53455 et 46223 sont positives. Les séquences obtenues sont identiques à la séquence de référence disponible pour ce gène (numéro d'accèsion GenBank JX204304).

À ce jour, trois gènes SIX ont été rapportés pour f.sp. *fragariae*, soit les gènes SIX 1, 6 et 13. Le gène SIX 6 a été amplifié pour la souche 46223 et sa séquence est identique à la séquence de référence pour *fragariae* (OR743726). Le gène SIX 6 a également été amplifié pour la souche 51302 isolée de la fraise, mais sa séquence est très différente de la séquence de référence de *fragariae* (sa pathogénicité n'a pas été testée). D'autres gènes SIX ont été observés pour d'autres souches, soit le gène SIX 14 chez la souche 40504 (séquence proche de *pisi*), ainsi que le SIX2 chez la souche U1145 (séquence similaire à 92% avec *cubense*).

Utilisation des tests dans un contexte de diagnostic

Selon les résultats obtenus, les amorces spécifiques à *fragariae* développées par Suga et al. (2013) ont été en mesure d'amplifier les deux souches de *fragariae* de la collection.

Les gènes SIX sont peu documentés pour la forme spéciale *fragariae*. Avec les amorces de Czislawski, seulement une des deux souches de *fragariae* semble posséder le gène SIX6. Aucune des deux souches ne semble posséder le gène SIX1, malgré la mention de ce gène chez cette forme spéciale (Czislawski et al., 2021). Nos deux souches sont également négatives pour le gène SIX 1 en utilisant les amorces de van der Does et al. (2008). De même, aucune amplification du gène SIX 13 n'a été obtenue pour les deux souches. L'utilisation des gènes SIX pour l'identification de f.sp. *fragariae* pourrait donc servir d'outil de validation plutôt que de test principal.

Généralité sur les gènes SIX (secreted in xylem gene)

Un total de 81 autres isolats de *F. oxysporum* isolés de diverses cultures (voir tableau 19) ont également été testés pour les 14 gènes SIX en utilisant les amorces universelles de Czislawski et al. (2021). Un ou plusieurs gènes SIX ont été trouvés chez 19 d'entre elles (Tableau 19). Ces souches proviennent principalement de la betterave (7) et de la carotte (7), mais également du brocoli (2), de l'asperge (1), du bleuet (1) et de la vigne (1). Le séquençage des gènes SIX obtenu ne permet pas d'identifier une forme spéciale en particulier. Plusieurs des séquences du gène SIX 9 (groupe 1) sont identiques à la séquence de référence de *cepae*, mais comme ces souches ne possèdent aucun autre gène SIX, elles peuvent difficilement être identifiées à *cepae*. Les autres formes spéciales connues dans la littérature pour posséder le gène SIX 9 sont *dianthi* (œillet), *narcissi* (narcisse), *palmarum* (palmier), *zingiberis* (gingembre), *cubense* (banane), *niveum* (melon d'eau) et *passiflora* (passiflore).

Dans la collection complète comprenant 158 souches, vingt souches possèderaient le gène SIX 2. Selon l'alignement de leur séquence, ces souches se divisent entre trois groupes d'homologie. Un premier groupe inclut 7 souches, et leur séquence sont toutes identiques à celle obtenue pour *lycopersici*. Les isolats de ce groupe proviennent du poivron (2), de la laitue (2), du bleuet (1) et de l'épinard (1). Un deuxième groupe de 9 souches comprend principalement des souches isolées de la laitue (5), mais aussi de l'épinard (2), de la betterave (1) et de la fraise (1). Finalement, un troisième groupe comprend 4 souches provenant principalement de l'ail (3) mais également de l'asperge (1).

Tableau 19. Résultats de l'amplification des 14 gènes SIX avec les amorces de Czislawski et al. (2021), pour les souches isolées de cultures autres. Seulement les souches pour lesquelles des gènes SIX ont été amplifiés sont montrées dans le tableau.

Souche	Culture	SIX2	SIX 8	SIX9 G1	SIX 14
36263	Asperge	Positif/ 100% 3017	Négatif	<i>cepae</i>	Négatif

760.1	Betterave	Positif / 100% 945.01	Positif / non séquencé	Négatif	Négatif
619.6	Betterave	Négatif	Négatif	<i>cepae</i>	Négatif
760.1	Betterave	Négatif	Négatif	<i>cepae</i>	Négatif
619.2B	Betterave	Négatif	Négatif	1 snp <i>cubense</i> /1 snp <i>pisi</i>	Négatif
619.4A	Betterave	Négatif	Négatif	<i>cepae</i>	Négatif
619.4B	Betterave	Négatif	Négatif	1 snp <i>cubense</i> /1 snp <i>pisi</i>	Négatif
619.5B	Betterave	Négatif	Négatif	<i>cepae</i>	Négatif
44569	Bleuet	Positif / <i>lycopersici</i>	Négatif	1 snp <i>cubense</i> /1 snp <i>pisi</i>	Négatif
681.11	Brocoli	Négatif	Négatif	2 snp <i>cubense</i> /3 snp <i>pisi</i>	Négatif
1355.01	Brocoli	Négatif	Négatif	<i>cepae</i>	Négatif
682.7	Carotte	Négatif	Négatif	Positif / non séquencé	Négatif
U1417	Carotte	Négatif	Négatif	Positif / non séquencé	Négatif
U236	Carotte	Négatif	Négatif	<i>cepae</i>	Négatif
U606A	Carotte	Négatif	Négatif	Positif / non séquencé	Négatif
U617	Carotte	Négatif	Négatif	<i>cepae</i>	Négatif
U645	Carotte	Négatif	Négatif	1 snp <i>cubense</i> /1 snp <i>pisi</i>	Négatif
U279	Carotte	Négatif	Négatif	Négatif	<i>pisi</i> (1snp)
36620	Vigne	Négatif	Négatif	1 snp <i>cubense</i> /1 snp <i>pisi</i>	Négatif

Dans le cadre du projet, l'amplification des gènes SIX a été possible grâce à l'utilisation de plusieurs paires d'amorces développées par différentes équipes scientifiques. Nous avons regroupé sous forme de tableau les formes spéciales amplifiées ou non amplifiées par ces différentes paires d'amorces, et ce pour les 14 gènes SIX (tableaux 20.1 et 20.2). Ces tableaux ont été construits en se basant sur les informations contenues dans les publications scientifiques, sur des alignements que nous avons réalisés avec des séquences de référence obtenues de NCBI, ainsi que sur nos propres résultats d'amplification ou non amplification réalisée sur notre banque de souches.

Tableau 20.1 Amplification ou non amplification des formes spéciales possédant le gène SIX, dépendamment de la paire d’amorces utilisée pour les gènes SIX1 à SIX 7. Les résultats combinent les informations présentées dans les articles de référence, des alignements réalisés avec des séquences obtenues de NCBI et nos propres résultats d’amplification par PCR.

Références de la paire d'amorces	Amplification ou non	SIX 1	SIX 2	SIX 3	SIX 4	SIX 5	SIX 6	SIX 7
Amorces de van der Does et al. 2008	Amplifié	apii, lycopersici, , canariensis conglutinans, cubense, lini, pisi, coriandrii	lycopersici,	lycopersici (race 3 distinguable), cepae, conglutinans				
	Non amplifié*							
Amorces de Lievens et al. 2009	Amplifié				lycopersici race 1	lycopersici, cepae	lycopersici, radicle-cucumerinum, melonis, niveum (idem. radicle-cucumerinum et melonis), cubense, vasinfectum, Colletrotrichum sp., betae, phaseoli	lycopersici, cepae, cubense, dianthii (idem. narcissi), lillii, canariensis, lini, pisi race 1, narcissi, freesia,
	Non amplifié							
Amorces de Van Dam et al. 2018	Amplifié	fp7310-fp7327 = melonis						
	Non amplifié							
Amorces de Cziolowski et al. 2021	Amplifié	lycopersici, fragariae^a, conglutinans, medicagini, cubense	lycopersici, cubense	lycopersici, cepae, sesami	lycopersici R1, niveum,conglutinans, cubense	lycopersici, cepae	lycopersici (idem phaseoli), radicle-cucumerinum (idem niveum, melonis), fragariae^b, cubense, niveum, passiflora, phaseoli, vasinfectum	lycopersici (idem. physali),cepae narcissi, dianthii (idem. narcissi), physali, sesami, zingiberi
	Non amplifié	physali					cucumerinum	

* Nous considérons que deux SNP observés sur les amorces sont nécessaires pour ne pas être en mesure d'amplifier le fragment.

En gras, les formes spéciales étudiées dans le projet.

Souligné quand la séquence complète est identique à une autre forme spéciale.

^a Amplification obtenue par l'équipe de Cziolowski et al. (2021). 1 SNP observé sur l'amorce antisens. Aucune amplification obtenue pour les souches 46223 et 53455 de f.sp. *fragariae*.

^b La souche 46223 pathogène à la fraise est amplifiée avec les amorces de Cziolowski. La séquence est homologue à 98.8% avec la souche OR743726 de f.sp. *fragariae*, déposée sur NCBI (National Center of Biotechnology Information) en novembre 2023. Une seule mention du gène SIX 6 chez f.sp. *fragariae* (Dilla-Ermita et al., 2023)

NB. Beaucoup de formes spéciales n'ont pas de séquences disponibles pour ces gènes dans la banque de donnée NCBI. Il est donc possible que d'autres f.sp. puissent également être amplifiées avec ces marqueurs.

Tableau 20.2 Amplification ou non amplification des formes spéciales possédant le gène SIX, dépendamment de la paire d'amorces utilisée pour les gènes SIX8 à SIX 14. Les résultats combinent les informations présentées dans les articles de référence, des alignements réalisés avec des séquences obtenues de NCBI et nos propres résultats d'amplification par PCR.

Références de la paire d'amorces	Amplification ou non	SIX 8	SIX 9	SIX 10	SIX 11	SIX 12	SIX 13	SIX 14
Amorces de Meldrum et al. 2012	Amplifié	<u>spinaciae^c</u> , <u>ciceris</u> , pisi race 1,2,5 (<u>idem. ciceris</u>) palmarum, phaseoli, cubense,						
	Non amplifié*	niveum, sesami						
Amorces de Taylor et al. 2016	Amplifié		FOL = lycopersici , dianthi, narcissi, palmarum, FOC = cepae	lycopersici , cepae , canariensis, lini, pisi R1, narcissi, freesia,	lycopersici , phaseoli, pisi R1	lycopersici , canariensis, lini, pisi R1, narcissi, freesia	lycopersici , lini, pisi R2-3, freesia,	FOL= lycopersici , pisi R1-2, freesia FOC = cepae
	Non amplifié				albedinis, lycopersici races 1 et 3, spinaciae ^e			
Amorces de Van Dam et al. 2018	Amplifié						fp7305-fp7322 = radicis-cucumerinum	
	Non amplifié						niveum	
Amorces de Cziolowski et al. 2021	Amplifié	lycopersici , <u>spinaciae (idem. niveum et sesami)</u> , passiflora, <u>niveum^d</u> , conglutinans, cubense, <u>sesami</u>	G1 = cepae , <u>narcissi</u> , <u>dianthii (idem. narcissi)</u> , pisi, sesami, zingiberi, cubense. G2 = lycopersici , niveum, passiflora,	lycopersici , cepae , pisi ace 1 et 5, physali, sesami, <u>dianthii</u> , <u>narcissi (idem. dianthii)</u> , lini, zingiberi	lycopersici (idem. Phaseoli, spinaciae) , <u>spinaciae^c (idem. lycopersici)</u> , <u>radicis-cucumerinum (idem. niveum)</u> , passiflora, niveum, phaseoli, sesami, pisi race 1, 2 et 5, <u>lentis</u> , <u>ciceris (idem pisi et lentis)</u> vasinfectum, <u>tracheiphilum (1snp lycopersici)</u> , <u>passiflora</u> , <u>albedinis (idem. passiflora)</u> , <u>niveum</u>	<u>lycopersici</u> , <u>cepae</u> , <u>physali (idem. lycopersici)</u> , <u>narcissi</u> , <u>dianthii (idem. narcissi)</u> , pisi, zingiberi	lycopersici , fragariae^f , radicis-cucumerinum , niveum, sesami, ciceris, <u>narcissi</u> , (<u>idem. pisi</u>), physalivasinfectum, medicaginis, cubense	lycopersici , spinaciae , ciceris (1 snp amorce antisens), vasinfectum,
	Non amplifié		G1 = lycopersici, niveum, passiflora. G2= cepae, narcissi, dianthii (idem. narcissi), pisi, sesami, zingiberi, cubense					sesami, cepae, pisi

* Nous considérons que deux SNP observés sur les amorces sont nécessaires pour ne pas être en mesure d'amplifier le fragment.

En gras, les formes spéciales étudiées dans le projet.

Souligné quand la séquence complète est identique à une autre forme spéciale.

^c Aucune amplification obtenue pour la souche ATCC90152 de f.sp. *spinaciae*

^d Amplifie selon l'article Cziolowski et al. (2021). Alignement montre un SNP sur l'amorce antisens.

^e Une souche de *spinaciae* (Fus004, MK906677) sur un total de 39 est positif (Batson 2019). La souche ATCC90152 n'a pas amplifié.

^f Aucune amplification pour les souches 46223 et 53455 de f.sp. *fragariae*.

Conclusion générale et résumé des outils développés

Il est maintenant connu que le génome de *F. oxysporum* est composé d'un corps de chromosomes contenant les gènes essentiels à sa survie et sa reproduction, ainsi qu'un ensemble de plus petits chromosomes, non-essentiels, mais connus pour contenir les gènes liés entre autres à la pathogénicité, tels que les gènes SIX ou codant pour d'autres protéines effectrices. Ces chromosomes sont désignés comme des chromosomes *lignées spécifiques*, (Armitage et al., 2018), ils sont mobiles et sont souvent transmis par transfert horizontal à d'autres *F. oxysporum* (Henry et al., 2021). Comme l'acquisition des gènes de pathogénicité est majoritairement faite par ce transfert génétique, des souches appartenant à des formes spéciales différentes peuvent être plus proches génétiquement entre elles que des souches appartenant à la même forme spéciale (Van Dam, 2018; Lievens et al., 2009). Ainsi, l'utilisation de gènes conservés, tel que le facteur d'élongation (*elongation factor 1-alpha gene*), ne peut pas être utilisé pour déterminer la forme spéciale d'un *F. oxysporum* (van Dam, 2018). Les connaissances liées à la position des gènes de pathogénicité sur ces chromosomes auxiliaires sont connues pour certaines formes spéciales mais restent inconnues pour la majorité. Par exemple, chez *lycopersici*, le chromosome 14 est connu pour contenir tous les gènes SIX sauf un (van Dam, 2018). Chez *radicis-cucumerinum*, le chromosome Chr_{rc} est similaire au chromosome 15 de *lycopersici*, et contiendrait le gène SIX 6, responsable de la pathogénicité de *r-cucumerinum* envers le concombre (van Dam, 2017). Tous les gènes de pathogénicité des différentes formes spéciales ne sont donc pas tous situés aux mêmes endroits dans le génome et la tâche visant à les identifier n'est pas chose facile. De plus, les chromosomes portant les gènes de pathogénicité sont de courte taille et sont composés d'un grand nombre d'éléments transposables et de séquences répétées, rendant la tâche d'assemblage fastidieuse, et augmentant la possibilité d'erreur à l'assemblage (Armitage et al., 2018; Kashiwa et al., 2016). Les nouveaux outils de séquençage permettant le séquençage de longs fragments, tel que PacBio ou encore Nanopore, sont cependant une avenue recherchée pour contrer ce problème (van Dam, 2017). Néanmoins, un travail préalable majeur a besoin d'être fait afin de pouvoir développer un outil de séquençage de troisième génération qui viserait un ensemble de formes spéciales. Malheureusement ce travail n'a pas pu être effectué dans le cadre du projet.

Au terme du projet, l'utilisation de différents tests PCR classiques et quantitatifs pour l'identification des formes spéciales *lycopersici*, *radicis-cucumerinum*, *cepaе*, *spinaciae*, *lactucae* (race 1), *fragariae* et *apii* a été évaluée. Ces tests PCR ont pour la majorité été développés sur des gènes de pathogénicité propres à chaque forme spéciale. Selon les résultats obtenus, les outils suivants peuvent être utilisés dépendamment de la forme spéciale de *F. oxysporum* visée :

- f.sp *lycopersici* races 1, 2 et 3 : amplification par PCR classique, séquençage SANGER et alignement des gènes SIX 3 (amorces développées par van der Does et al., 2008) et SIX 4 avec les séquences de références
- Formes spéciales des cucurbitacées (*cucumerinum*, *radicis-cucumerinum*, *niveum* et *melonis* non-distinguable) : amplification par PCR classique du gène HPEG à l'aide des amorces développées par van Dam et al. (2018)
- f.sp. *radicis-cucumerinum*: amplification par PCR classique, séquençage SANGER et alignement avec les séquences de référence, des gènes SIX 6 et SIX 13 à l'aide des amorces développées par Czislawski et al. (2021) ou van Dam et al. (2018) (SIX 13 seulement)
- f.sp. *cepaе* : amplification de l'effecteur C5 par PCR classique développé par Taylor et al. (2016) ou amplification par PCR classique, séquençage SANGER et alignement sur des séquences de référence des gènes SIX 3, 5, 7, 10 ou 12 ou une combinaison de ces gènes, à l'aide des paires d'amorces développées par Czislawski et al. (2021)
- f.sp *spinaciae* : amplification et quantification par PCR quantitatif du gène effecteur Fos (1 et 2) développé par Batson et al. (2023) ou amplification par PCR classique, séquençage SANGER et alignement sur des séquences de référence du gène SIX 14 à l'aide des amorces développées par Czislawski et al. (2021)
- f.sp. *lactucae* race 1: amplification par PCR classique d'un inter-transposon, à l'aide des amorces développées par Pasquali et al. (2007). Un séquençage SANGER suivi d'un alignement avec une séquence de référence peut être effectué dans une étape de validation
-

- f.sp. *fragariae* : amplification par PCR classique d'un élément transposable, à l'aide des amorces développées par Suga et al. (2013). Une validation par séquence SANGER suivie d'un alignement avec la séquence de référence est également possible
- f.sp. *apii* : aucune souche de cette forme spéciale n'a pu être caractérisée. Les amorces spécifiques aux races 2 et 4 de *apii*, développées par Epstein et al. (2017) ont été évaluées dans le cadre du projet, mais n'ont pas pu être validées.

Références

- Armitage, A. D., Taylor, A., Sobczyk, M. K., Baxter, L., Greenfield, B. P. J., Bates, H. J., et al. (2018). Characterisation of pathogen-specific regions and novel effector candidates in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Sci. Rep.* 8:13530. doi: 10.1038/s41598-018-30335-7
- Batson A. 2019. Identification of effector genes for the spinach fusarium wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *spinaciae*. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Plant Pathology. Washington State University.
- Batson A.M., Woodhall J.W., and du Toit L.J. 2023. Real-Time PCR Assays for Races of the Spinach Fusarium Wilt Pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Spinaciae*. *Plant Disease* 107(9), 2633-2342.
- Claerbout, J., Venneman, S., Vandeveld, I., Decombel, A., Bleyaert, P., Volckaert, A., et al. (2018). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 4 on lettuce in Belgium. *Plant Dis.* 102, 1037.
- Czislowski E., Zeil-Rolfe I. et Aitken E.A.B. 2021. Effector profiles of endophytic *Fusarium* associated with asymptomatic banana (*Musa* sp.) hosts. *International Journal of Molecular Sciences.* 22(5):2508.
- Dilla-Ermita, C.J., Goldman, P.H., Jaime, J., Ramos, G., Pennerman, K., Henry, P.M. 2023. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* race 2 causing Fusarium wilt of strawberry (*Fragaria × ananassa*) in California. *Plant Disease.* 107. Article 2849. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-23-0217-PDN>.
- Epstein L., Kaur S., Chang P.L., Carrasquilla-Garcia N., Lyu G., Cook D.R., Subbarao K. and O'Donnell K. 2017. Races of the celery pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *apii* are polyphyletic. *Phytopathology* 107:463-473.
- Fujinaga M., Ogiso H., Tsuchiya N., and Saito H. 2001. Physiological Specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, a Causal Organism of Fusarium Root Rot of Crisp Head Lettuce in Japan. *J. G. Plant Path.* 67, 205–206
- Fujinaga M., Ogiso H., Tsuchiya N., Saito H., Yamanaka S., Nozue M. et Kojima M. 2003. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a differential system with commercial cultivars. *J. G. Plant Path.* 69, 23–28
- Fujinaga M, Yamagishi N, Ishiyama Y, Yoshiwaza E, 2014. PCR-based race differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Annual Report of the Kanto-Tosan Plant Protection Society* 61, 47–9.
- Gálvez, L., Brizuela, A. M., Garcés, I., Cainarca, J. S., and Palmero, D. 2023. First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* Race 4 Causing Lettuce Wilt in 2 Spain. *Plant Dis.* 107 (8), 2549.
- Gilardi G., Franco Ortega, S., Rijswick P., Ortu G., Gullino, M.L., et Garibaldi A. 2017. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce. *Plant Pathol.* 66, 677–688.
- Gilardi G., Garibaldi A., Matic S., Senatore M. T., Pipponzi S., Prodi A. and Gullino M. L. (2019) First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* Race 4 on Lettuce in Italy. *Plant Disease.* 103 (10).

- Henry P, Kaur S, Pham QAT, Barakat R, Brinker S, Haensel H, Daugovish O, Epstein L. Genomic differences between the new *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* (Foa) race 4 on celery, the less virulent Foa races 2 and 3, and the avirulent on celery f. sp. *coriandrii*. BMC Genomics. 2020 Oct 20;21(1):730. doi: 10.1186/s12864-020-07141-5. PMID: 33081696; PMCID: PMC7576743.
- Henry P.M., Pincot D.D.A., Jenner B.N., Borrero C, Aviles M., Nam M.H., Epstein L., Knapp S.J., Gordon T.R. 2021. Horizontal chromosome transfer and independent evolution drive diversification in *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. New Phytol. 230(1):327-340. doi: 10.1111/nph.17141. Epub
- Huang X.Q., Lu X.H., Sun M.H. et al. 2019. Transcriptome analysis of virulence-differentiated *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* isolates during cucumber colonisation reveals pathogenicity profiles. BMC Genomics 20, 570. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5949-x>
- Jangir P., Mehra N., Sharma K., Singh N., Rani M., Kapoor R. 2021. Secreted in Xylem Genes: Drivers of Host Adaptation in *Fusarium oxysporum*. Front Plant Sci.12:628611. doi: 10.3389/fpls.2021.628611. PMID: 33968096; PMCID: PMC8101498.
- Kashiwa T, Kozaki T, Ishii K, Turgeon BG, Teraoka T, Komatsu K, Arie T. 2017. Sequencing of individual chromosomes of plant pathogenic *Fusarium oxysporum*. Fungal Genet Biol. 98:46-51. doi: 10.1016/j.fgb.2016.12.001.
- Lievens B., Houterman P.M. et Rep M. 2009. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. FEMS Microbiol Lett 300, 201-2015
- Lin Y. H., Lai P. J., Chan, T. H., Wan Y. L., Huang J. W., Huang J. H., et al. 2014. Genetic diversity and identification of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Taiwan. Eur. J. Plant Pathol. 140, 721–733.
- McDonald, Mary & Collins, Brian & duToit, Lindsey & Adusei-Fosu, Kwasi. (2021). Soil amendments and fumigation for the management of Fusarium wilt of bunching spinach in Ontario, Canada. Crop Protection. 145. 105646. 10.1016/j.cropro.2021.105646.
- Meldrum R.A., Fraser-Smith S., Tran-Nguyen L.T.T., Daly A. M. et Aitken E. A. B. 2012. Presence of putative pathogenicity genes in isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Australia. Australasian Plant Pathology. 41, 551–557
- Mestdagh H, Van Poucke K, Haegeman A, Dockx T, Vandeveldel I, Dendauw E, Decombel A, Höfte M, Heungens K. 2023. Detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* race 1 and 4 via race-specific real-time PCR and target enrichment. Front Plant Sci. 14:1272136. doi: 10.3389/fpls.2023.1272136.
- Pasquali M., Dematheis F., Gullino M.L., and Garibaldi A. 2007. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. Phytopathology 97:987-996.
- Paugh, R.K. and Gordon, R.T. 2020. The population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in California and Arizona. Plant disease. 104:1811-1816.
- Suga H., Hiraya Y., Morishima, M., Suzik T., Kageyama K. et Hyakumachi M. 2013. Development of PCR primers to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. Plant Dis. 97: 619-625.
- Taylor, A., Jackson, A. C., and Clarkson, J. P. 2019. First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* Race 4 Causing Lettuce Wilt in England and Ireland. Plant Dis. 103 (5), 1033
- Taylor A., Vagany V., Jackson A.C., Harrison R.J., Rainoni A. and Clarkson J.P. 2016. Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. Molecular plant pathology 17(7), 1032-1047.
- Van der Does H. C., Lievens B., Claes L., Houterman P.M., Cornelissen B.J.C. et Rep M. 2008. The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. Environmental Microbiology. 10(6), 1475-1485.

Van Dam P., De Sain M., Ter Horst A. Van der Gragt M. and Rep M. 2018. Use of comparative genomics-based markers for discrimination of host specificity in *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology* 84: e01868-17

DIFFUSION DES RÉSULTATS

Présentations

10 novembre 2020, Montréal, Canada – 20 personnes

Bilodeau, G.J. Enjeux en gestion des espèces invasives et des outils mis en place aux pour réguler ces enjeux: Comment repère-t-on une maladie / un ennemi émergent-e au niveau du Fédéral Outils et processus (en cas de découverte) « Détection/identification d'agents phytopathogènes réglementés utilisant des données de génomes et métagénomiques. ». Département des Sciences Biologiques, l'Université de Montréal, Cours en Gestion de Biodiversité. Présentation virtuelle.

16 novembre 2021, Québec, Canada – 40 personnes

Bilodeau, G.J. La génomique et métagénomique pour le développement d'outils de détection d'agents phytopathogènes réglementés, Laboratoire de recherche sur l'identification des agents pathogènes, Agence canadienne d'inspection des aliments. L'Édition 2021 de la Journée de Recrutement du département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique (BMB) Université Laval. Présentation virtuelle.

3 février 2022, Manitoba, Canada – 30 personnes

Bilodeau, G.J. High throughput sequencing technologies used in plant pathology regulatory research: From marker development to metagenomics. Advanced Plant Science Seminar Schedule Winter. Faculty of Agricultural and Food Sciences. Université du Manitoba. Présentation virtuelle.

2 novembre 2022, Ottawa, Canada – 100 personnes

Bilodeau Guillaume. Sequencing technologies used in plant pathology regulatory research for prescreening or early detection. Journée de la recherche de Fallowfield-Carling. <https://pheedloop.com/FC2022/site/abstracts/>

4-8 juillet 2022, Canada – 200 personnes

Bilodeau, G.J, Charron, G., Yergeau, J., Tanguay, P., Beaulieu, C., and Van der Heyden, H. Identification of *Phytophthora europaea* as the species responsible for root-rot in Christmas tree productions and development of molecular tools for its detection. Rencontre annuelle de la CPS. Présentation virtuelle.

6 juillet 2022, Canada – 300 personnes

Charron, G., Yergeau, J.; Bilodeau, G. J.; Tanguay, P.; Beaulieu, C.; Van Der Heyden, H. Identification of *Phytophthora europaea* as the species responsible for root-rot in Christmas tree productions and development of molecular tools for its detection. 2022 annual meeting of the Canadian Phytopathological Society

30 septembre 2022, Québec, Canada – 40 personnes

Charron, G, Yergeau, J.; Bilodeau, G.J.; Tanguay, P.; Beaulieu, C.; Van Der Heyden, H. Identification de *Phytophthora europaea* comme espèce responsable de la pourriture racinaire dans les productions de sapins de Noël et développement d'un test moléculaire pour sa détection. Congrès annuel 2022 de la Société de Protection des Plantes du Québec.

24 novembre 2022, Canada – 12 personnes

Bilodeau Guillaume. High throughput sequencing technologies used in plant pathology regulatory research: From marker development to metagenomics. Réunion de Laboratoire de Mamadou L. Fall, AAFC. Présentation virtuelle (invitation)

24 février 2023, Orford, Canada – 100 personnes

Philippe Tanguay. Diversité et virulence des *Phytophthora* causant la pourriture racinaire dans les plantations d'arbres de Noël du Québec. Réunion annuelle de l'Association des Producteurs d'Arbres de Noël du Québec

20-25 août 2023, Lyon, France – 150 personnes

Bilodeau Guillaume J., Van der Heyden Hervé, Charron Guillaume, and Philippe Tanguay. Prescreening and Monitoring of Forest Plant Pathogens Using Sequencing Technologies in Regulatory Research. 12th International congress of plant pathology. <https://www.icpp2023.org/sites/default/files/2023-08/ICPP2023-BOOK-ABSTRACTS-VF.pdf>

28-30 novembre 2023, Ottawa, ON, Canada – 280 personnes

Bilodeau Guillaume J., Van der Heyden Hervé, Charron Guillaume, and Philippe Tanguay. Prescreening and Monitoring of Forest Plant Pathogens Using Sequencing Technologies in Regulatory Research (Oak Wilt, *Phytophthora* Root Rot). Forest Pest Management Forum. <https://www.eventcreate.com/e/forum66>

1er mars 2024, Orford, Canada - 100 personnes

Tanguay, P. Mise à jour sur la pourriture racinaire à *Phytophthora*, une maladie du sapin qui se promène dans le sol. Colloque annuel de l'Association des Producteurs d'Arbres de Noël du Québec.

6-7 juin 2024, Wendaki, Canada – présentation prévue

Piuzé-Paquet A. et Sauvageau A. Développement d'outils moléculaire et de séquençage de troisième de générations pour la détection des formes spéciales de *Fusarium oxysporum* en production maraichère et les complexes bactériens de l'oignon. Congrès annuel 2024 de la Société de Protection des Plantes du Québec.

Autres publications

Bilodeau G.J., Van der Heyden H., Charron G. et Tanguay P. 2023. Prescreening and monitoring of forest plant pathogens using sequencing technologies in regulatory research. 12th International congress of plant pathology. Book of abstract. C4-5-4, P18. (Résumé). <https://www.icpp2023.org/sites/default/files/2023-08/ICPP2023-BOOK-ABSTRACTS-VF.pdf>

Charron G., Yergeau J., Bilodeau G.J., Tanguay P., Beaulieu C. et Van der Heyden H. 2023. Identification of *Phytophthora eupaeae* as the species responsible for root-rot in Christmas tree productions and development of molecular tools for its detection. Can. J. Plant Pathol. Vol. 45, no 3. 211. (Résumé). <https://doi.org/10.1080/07060661.2023.2202486>

Piuzé-Paquet A. et Sauvageau A. Développement d'outils moléculaire et de séquençage de troisième de générations pour la détection des formes spéciales de *Fusarium oxysporum* en production maraichère et les complexes bactériens de l'oignon. Congrès annuel 2024 de la Société de Protection des Plantes du Québec. (Résumé)

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE

Plusieurs outils moléculaires innovants permettant l'amélioration des capacités provinciales en matière de diagnostic et de surveillance phytosanitaire ont été développés pour trois complexes de maladie connu comme étant des ravageurs importants dans plusieurs cultures d'importance économique au Québec. Ainsi, les forêts, les cultures d'arbres de Noël ainsi que les cultures maraichères sont constamment menacées par différents ravageurs fongiques et bactérien ainsi que par l'arrivée de nouvelles espèces phytopathogènes envahissantes. En production d'arbres de Noël au Québec, les problèmes de pourriture racinaire sont importants et jusqu'à 25% d'incidence a été rapporté à ce jour. De la même manière, les maladies bactériennes dans la culture d'oignon est une des principales causes de déclassement à la récolte dans la culture d'oignon sec au Québec. Le Québec est la principale province productrice d'oignons secs au Canada et cette production représente une valeur économique importante, allant jusqu'à 113,5 millions de dollars pour le Québec seulement (Statistiques Canada, 2020). Enfin, le complexe de *Fusarium oxysporum* qui rassemble près de 150 formes spéciales différentes, est particulièrement dévastateurs et les mécanismes génétiques permettant sa spécialisation rapide ne soit pas à ce jour énormément étudiés.

Pour le complexe Phytophthoréen dans la culture de sapins de Noël, un test de PCR en temps réel spécifique au groupe *Phytophthora abietivora/europeae* a été conçu et un outil de séquençage (IonTorrent) permettant la détection de plusieurs oomycètes a également été développé ainsi que publié. De plus, l'utilisation de la méthodologie nanopore est également en évaluation pour ce même système (communication personnelle). Pour le complexe de bactérie de l'oignon, le séquençage de troisième génération utilisant la technologie Nanopore (MinIon) a été développé dans le cadre du projet et permet la détection en simultané des espèces du complexe bactérien provoquant la pourriture bactérienne dans la culture d'oignon. Pour les formes spéciales de *Fusarium oxysporum* dans les cultures maraichères, un total de 8 outils PCR et qPCR ont été adapté afin de distinguer plusieurs formes spéciales. Dans un contexte de biosurveillance, ces outils de métagénomiques et d'amplification par PCR vont permettre d'être proactifs et d'augmenter la boîte à outils disponible pour la gestion de ces groupes d'agents pathogènes et ce autant pour le Laboratoire de Diagnostic et d'Expertise en Phytoprotection que pour d'autres utilisateurs.

POINTS DE CONTACT POUR INFORMATION

Les complexes phytophthoraéens dans le sapin de Noël

Guillaume J. Bilodeau, CFIA/ACIA, 3851 Fallowfield Road, Nepean, ON, K2J 4S1, Canada.

Email : guillaume.bilodeau@inspection.gc.ca

Philippe Tanguay, Centre de Foresterie des Laurentides, 055, rue Du P.E.P.S., C.P. 10380, Québec, Québec, G1V 4C7, Canada.

Email : philippe.tanguay@NRCan-RNCan.gc.ca

Les complexes bactériens dans l'oignon

Anne Piuze-Paquet, Compagnie de recherche Phytodata inc, 291 rue de la Coopérative, Sherrington, QC, J0L2N0, Canada.

Email : apiuze@phytodata.ca

Les formes spéciales de *Fusarium oxysporum* dans les cultures maraîchères et la fraise

Andréanne Sauvageau, Compagnie de recherche Phytodata inc, 291 rue de la Coopérative, Sherrington, QC, J0L2N0, Canada.

Email : asauvageau@phytodata.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ce projet a été réalisé dans le cadre du volet 2 du programme Prime-Vert – Approche régionale et interrégionale avec une aide financière du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

Merci à Jean-François Légaré, Éric Dussault, Christian Lacroix, Dominique Choquette, et Jacinthe Drouin pour leur contribution au travail de terrain; Debbie Shearlaw, Miranda Newton et à tous les producteurs d'arbres pour l'accès à leurs plantations. Merci à Dr. Christopher Keeling, Marie-Krystel Gauthier, Marie-Josée Bergeron, et Véronique Lévesque-Tremblay pour leurs conseils techniques. L'équipe de réalisation souhaite également remercier tous les producteurs maraîchers ayant participé de loin ou de près au projet. Merci également aux différents stagiaires de Phytodata pour leur précieux travail.