



**Portrait provincial des profils de résistance aux fongicides dans les cultures de la fraise, de la vigne et de l'oignon**

**19-2.2-06-PHYTO**

DURÉE DU PROJET : AVRIL 2019 / DÉCEMBRE 2024

**RAPPORT FINAL**

**Réalisé par :**

Anne Piuze-Paquet, Phytodata

Hervé Van der Heyden, Phytodata (2019-2024)

**Collaborateurs:**

Odile Carisse, Agriculture et Agroalimentaire Canada

Anne-Sophie Walker, INRA

**Échantillonnage :**

Chloé Gendre, Club agroenvironnemental de l'Estrie

Julie Street, Durasol

Jacynthe Paré, Profit-eau-sol

Nadia Surdek, Pleine-Terre

Patrice Thibault, RLIO

Stéphanie Tellier, MAPAQ

Raphaël Fonclara, Dura Club

François Demers, Ecolo Max

Stéphanie Patenaude, Ferme Horticole Gagnon

**Décembre 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.

## **Portrait provincial des profils de résistance aux fongicides dans les cultures de la fraise, de la vigne et de l'oignon**

19-2.2-06-PHYTO

### **RÉSUMÉ**

L'utilisation des fongicides a longtemps été considérée comme un moteur de l'intensification de l'agriculture moderne et a contribué au cours des dernières décennies à augmenter les rendements, améliorer la qualité des produits et stabiliser les productions. Cependant, le milieu agricole assiste à l'émergence de résistance à certaines des plus importantes classes de fongicides, compromettant le contrôle de plusieurs maladies. Malgré le recours à de bonnes pratiques agricoles combinées à l'utilisation raisonnée de fongicides, des pertes de contrôle ont été rapportées dans différentes régions du Québec au cours des dernières années.

L'objectif de ce projet visait donc à 1) réaliser une revue de littérature sur la résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides au Québec et ailleurs; 2) réaliser, à l'aide d'outils moléculaires et de phénotypage, un inventaire régional de la résistance pour *Botrytis cinerea* (moisissure grise, fraise et vigne), *Botrytis squamosa* (brûlure de la feuille, oignon), *Colletotrichum acutatum* (anthracnose, fraise); 3) documenter, à l'aide d'outils moléculaires, le problème de résistance pour les parasites obligatoires *Podosphaera aphanis* (blanc, fraise), *Plasmopara viticola* (mildiou, vigne) et *Erysiphe necator* (blanc, vigne) et 4) constituer une banque de souches de référence.

Une revue de littérature sur l'état de la résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides au Québec et ailleurs dans le monde ainsi qu'un inventaire de la résistance dans la culture de la fraise et de la vigne au Québec ont été réalisés dans le cadre de ce projet. Grâce à la mobilisation de nos collaborateurs, 3060 échantillons ont été recueillis dans 8 régions administratives. Pour *B. cinerea*, c'est 1140 échantillons qui ont été recueillis chez 66 producteurs, dont 44 producteurs de fraises et 22 producteurs de vigne (total de 117 champs); pour *C. acutatum*, c'est 690 échantillons qui ont été prélevés chez 34 producteurs de fraises (69 champs) et pour *B. squamosa*, 370 échantillons ont été recueillis chez 11 producteurs d'oignons (20 champs). De plus, l'échantillonnage des parasites obligatoires qui a débuté en 2021 a permis de prélever 320 échantillons de *P. viticola* (26 producteurs de vigne), 200 échantillons de *E. necator* (18 producteurs de vigne) et 330 échantillons de *P. aphanis* (23 producteurs de fraises).

En résumé, pour *B. cinerea* dans la vigne et la fraise, la proportion d'isolats résistants est très élevée pour les fongicides du groupe 11 (92%) et la proportion d'isolats résistants aux fongicides du groupe 7 demeure modérée (60%). Toutefois, la résistance atteint 86% pour le bosalide. La proportion d'isolats résistants au fenhexamide du groupe 17 est modérée (43%). Pour ce qui est de la résistance aux fongicides du groupe 9, 49% des isolats du présent projet y sont résistants. La proportion d'isolats résistants au fludioxonile est très faible (4%). Pour *C. acutatum*, la proportion d'isolats résistants est très élevée pour les fongicides du groupe 11 (97%), mais très faibles pour les groupes 9 et 12. Comme attendu, les isolats de *C. acutatum* sont tous insensibles aux principales matières actives du groupe 7. Pour *B. squamosa*, l'incidence de la résistance est plutôt élevée pour les fongicides des groupes 3, 7 et 11, soit entre 60% et 80%, mais modérée pour le pyriméthanile (39%) et très faible pour le fludioxonile (5%). Pour *P. viticola*, aucune souche résistante aux fongicides du groupe 40 n'a été détectée, toutefois 11% des isolats se sont avérés hétérozygotes, c'est-à-dire porteurs de la mutation conférant la résistance à ce groupe sur un des deux allèles du gène *cesA3*. Pour ce qui est de la résistance aux fongicides du groupe 11, la proportion des échantillons résistants est modérée (61%). Pour *E. necator*, la proportion moyenne des échantillons résistants aux fongicides des groupes 3, 7 et 11 est moyenne à élevée, soit respectivement 45%, 33% et 68%.

Cette recherche permet d'atteindre les objectifs de la stratégie phytosanitaire québécoise en incitant une réduction de l'utilisation de fongicides inutiles grâce à l'acquisition de connaissances pratiques et à la mobilisation des producteurs et de leurs conseillers.

## OBJECTIFS ET APERÇU DE LA MÉTHODOLOGIE

L'objectif principal de ce projet consistait à documenter le problème de résistance aux fongicides dans différentes régions du Québec. Dans le cadre de ce projet, il s'agit des cultures de la fraise, de la vigne et de l'oignon. Les organismes suivants sont ciblés dans le cadre de ce projet : *Botrytis cinerea*, *Botrytis squamosa*, *Colletotrichum acutatum*, *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* et *Podosphaera aphanis*. Les protocoles détaillés ont été présentés en début de projet et approuvés par le comité d'évaluation, ceux-ci se retrouvent à l'annexe I du présent rapport. Un résumé de ces protocoles est présenté ci-après.

### Échantillonnage et collection de souches

L'échantillonnage a été réalisé grâce à la collaboration de conseillers de clubs conseils et du MAPAQ. Pour ce qui est de l'échantillonnage dans la vigne et la fraise, chaque conseiller a reçu en début de saison une trousse d'échantillonnage contenant des écouvillons, le protocole d'échantillonnage et une enveloppe retour préaffranchie. Pour chaque champ et chaque agent phytopathogène, 10 échantillons devaient être prélevés selon un parcours en « W ». Pour chaque échantillon, l'échantilleur devait frotter l'extrémité d'un écouvillon sur une lésion avec sporulation et fournir : la date d'échantillonnage, les coordonnées de la ferme et du champ, la liste des fongicides utilisés et une cote de sévérité de la maladie (0 à 3) pour l'ensemble du champ. Une fois au laboratoire, les écouvillons de moisissure grise et d'antracnose étaient frottés sur une gélose PDA contenant 100 ppm de novobiocine (isolation par épuisement) et incubés dans le noir pendant 24-48h. Suite à cette période d'incubation, des monocolonies étaient prélevées et repiquées sur gélose PDA (sans novobiocine). Pour s'assurer de ne pas perdre de souches et pour constituer une banque pouvant servir à d'autres recherches, chacune des souches isolées a été mise en conservation dans le sol à 4°C, pour une conservation à long terme. Dans le cas des écouvillons d'oïdium et de mildiou, ils ont été agités dans un tube vissé de 2 ml contenant 500 µl d'isopropanol afin de recueillir les spores et conservés à -20°C des prochaines étapes. Pour ce qui est de l'échantillonnage dans l'oignon, chaque échantillon était composé d'une dizaine de feuilles infectées. Les feuilles d'oignon ont été coupées en morceaux de 2 cm et placées dans une boîte de Pétri de 9 cm sur deux papiers filtres humidifiés. Les boîtes ont été laissées à température ambiante (18 °C à 23 °C) sous lumière naturelle pour favoriser la sporulation pendant 48 à 72 h. Les conidies ont été récoltées à l'aide d'un écouvillon stérile. Les conidies ont été transférées par étalement sur un milieu de culture PDA contenant 100 ppm de novobiocine. Les boîtes de Petri ont été placées à température ambiante pendant 48 à 72 h. Par identification visuelle, des colonies individuelles de *Botrytis spp.* ont été repiquées sur une boîte de Petri contenant une gélose PDA et incubées à température ambiante pendant 5 à 7 jours.

### Phénotypage

Les essais de phénotypage servent à déterminer pour chaque fongicide, la concentration nécessaire pour inhiber la croissance du champignon de 50% ( $Cl_{50}$ ). C'est cette valeur qui permet de déterminer si une souche est sensible ou résistante à une matière active donnée. Elle sert également à comparer le niveau de résistance pour les différentes souches et de les classer en catégories de résistance. La  $Cl_{50}$  est obtenue en ajustant un modèle non linéaire aux données de croissance obtenues pour différentes concentrations des matières actives testées. Pour y arriver, 7 doses ont été utilisées (0, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5 et 50 ppm) pour chaque produit à l'essai. Dans le cadre de ce projet et en accord avec la communauté scientifique, nous avons choisi de travailler avec les matières actives

individuelles pour éviter l'effet confondu des adjuvants et autres agents de remplissage contenus dans les formulations commerciales. Par ailleurs, dans le cas des fongicides qui contiennent plus d'une matière active, il a été choisi de réaliser les essais pour chaque matière active individuellement à moins que les résultats de génotypage ne soient contradictoires. En effet, il est généralement admis qu'une souche ayant les mutations conférant un phénotype de résistance aux deux matières actives individuelles aura également un phénotype résistant lorsque les matières actives sont utilisées en mélange. On mesure ensuite la croissance mycélienne ou la germination des spores, soit par mesure directe (croissance radiale) ou au spectrophotomètre (germination des spores). Les deux approches ont été utilisées dans le cadre de ce projet. Les bioessais de croissance mycélienne ont été effectués pour les isolats de *Colletotrichum acutatum*, et ce en utilisant des doses discriminantes, telles que déterminées par Fernandez-Ortuño et al. 2014, alors que les bioessais de germination des spores ont été effectués pour les isolats de *Botrytis cinerea* et de *Botrytis squamosa*, et ce par mesure de la densité optique selon le protocole de Stammler et Speakman (2006). Pour ce qui est des parasites obligatoires, faute d'avoir trouvé un étudiant de niveau maîtrise pour cet objectif du projet, il n'a malheureusement pas été possible d'effectuer les tests par bio essais sur disques foliaires, qui étaient nécessaires pour l'étape de phénotypage.

### **Calcul de la CI<sub>50</sub>**

À partir des valeurs de croissance obtenues à l'étape précédente, un modèle exponentiel décroissant à deux paramètres (EXD2) a été ajusté aux données afin d'estimer la CI<sub>50</sub> pour chacune des combinaisons « souche - matière active » testée. Le modèle EXD2 a été sélectionné après avoir évalué d'autres modèles, principalement des modèles log-logistique (LL2 et LL3) et Weibull (W2 et W3). La sélection du meilleur modèle était basée sur les critères de parcimonie (AIC et BIC) et les estimations de vraisemblance logarithmique. Ces analyses ont été réalisées avec le module « drc 3.0.6» disponible pour la suite R (V 3.6.3).

### **Génotypage**

L'ADN de chaque souche était extrait à l'aide de la trousse d'extraction commerciale FastDNA™ Kit (MP Biomedicals) selon le protocole du fabricant. La quantité et la qualité de l'ADN ont ensuite été évaluées au spectrophotomètre. Les extraits d'ADN étaient ensuite congelés jusqu'à leur utilisation. Pour déterminer s'il existe une relation entre le phénotype et le génotype, l'ADN de chaque souche était utilisé pour des fins de séquençage. Différents gènes ou régions géniques où se trouvent les mutations associées aux phénotypes résistants (*cytb*, *sdhB*, *OS-1*, *erg-27*, *CYP51* et *CesA3*) ont été préalablement sélectionnés. Une amplification par PCR était effectuée pour chaque souche et chaque région génique et les produits PCR étaient envoyés à la Plateforme de Séquençage et de Génotypage des Génomes du CHUL, pour y être séquencés. Les séquences obtenues étaient ensuite analysées et comparées aux séquences de références et chaque séquence était annotée selon qu'elle possédait la mutation responsable de la résistance ou non.

### **Relation phénotype-génotype**

L'effet de chaque mutation détectée dans le cadre de l'inventaire sur la sensibilité des isolats aux fongicides a été décrit grâce au phénotypage de nombreuses souches. Cette étape permettait d'établir la relation entre la CI<sub>50</sub> des souches obtenues par bio essai et le génotype de celles-ci. Cette relation permettait d'interpréter adéquatement les résultats obtenus par biologie moléculaire. Effectuer les tests de détection de la résistance par biologie moléculaire, lorsque ceux-ci sont disponibles, est plus rapide que par bioessai, cette méthode est particulièrement avantageuse lorsqu'on souhaite traiter une grande quantité d'échantillons. De plus la méthode par biologie moléculaire permet d'éviter la manipulation de matières actives potentiellement dangereuses pour la santé humaine.

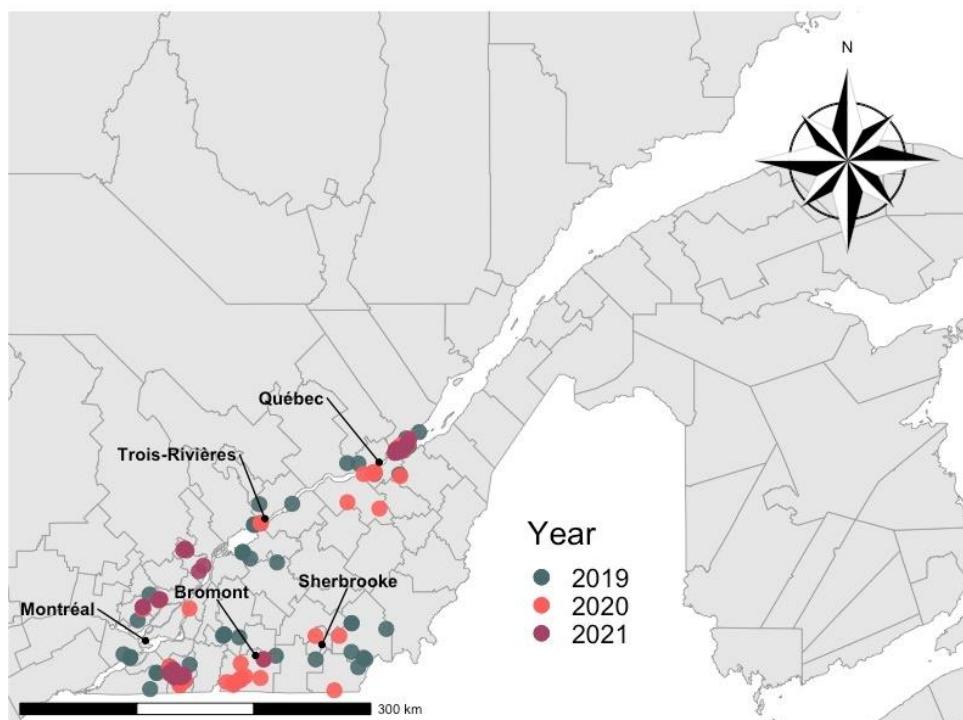
## RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS

### Revue de littérature

Une première version de la revue de littérature a été produite en 2020. Elle comprend des définitions pour les principaux termes utilisés, les mécanismes de résistance et les facteurs liés à leur développement, les mécanismes spécifiques, les méthodes de détection et un aperçu des niveaux de résistance pour certains agents pathogènes au Québec et ailleurs dans le monde. Dans cette démarche de revue de littérature, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont été utilisés pour expliquer certains des concepts présentés. La version finale de cette revue de littérature a été soumise avec le présent rapport (Annexe II).

### Inventaire des résistances

Malgré une pression de la maladie variable d'une année à l'autre et grâce à la mobilisation de nos collaborateurs, 3060 échantillons ont été recueillis dans 8 régions administratives (Capitale nationale, Centre-du-Québec, Chaudière-Appalaches, Estrie, Mauricie, Laurentides, Lanaudière et Montérégie) (Figure 1). Pour *B. cinerea*, c'est 1140 échantillons qui ont été recueillis chez 44 producteurs de fraises et 22 producteurs de vigne (117 champs au total); pour *C. acutatum*, c'est 690 échantillons qui ont été prélevés chez 34 producteurs de fraises (69 champs) alors que pour *B. squamosa*, 260 échantillons ont été recueillis chez 11 producteurs d'oignons (20 champs). L'échantillonnage des parasites obligatoires a débuté en 2021, ce qui a permis de prélever 320 échantillons de *P. viticola* (26 producteurs de vignes), 200 échantillons de *E. necator* (18 producteurs de vigne) et 330 échantillons de *P. aphanis* (23 producteurs de fraises).



**Figure 1.** Distribution des sites échantillonnés entre 2019 et 2021 pour *Botrytis cinerea*, *Botrytis squamosa* et *Colletotrichum acutatum*

**Tableau 1.** Synthèse des échantillons de moisissure grise (*Botrytis cinerea*) reçus et testés dans le cadre du projet

Année	Région administrative	Nombre d'écouvillons reçus		Nombre de souches isolées et testées	
		Fraise	Vigne	Fraise	Vigne
2019	Capitale-Nationale	80	0	59	0
2019	Centre-du-Québec	50	0	49	0
2019	Chaudière-Appalaches	40	0	33	0
2019	Estrie	60	60	50	51
2019	Laurentides	30	0	25	0
2019	Mauricie	60	0	52	0
2019	Montérégie	50	80	49	69
2019	<b>TOTAL</b>	<b>370</b>	<b>140</b>	<b>317</b>	<b>120</b>
2020	Capitale-Nationale	90	0	65	0
2020	Chaudière-Appalaches	40	0	32	0
2020	Estrie	40	140	17	117
2020	Laurentides	30	0	30	0
2020	Mauricie	20	0	17	0
2020	Montérégie	0	60	0	49
2020	<b>TOTAL</b>	<b>220</b>	<b>200</b>	<b>161</b>	<b>166</b>
2021	Capitale-Nationale	100	0	78	0
2021	Centre-du-Québec	10	0	0	0
2021	Estrie	0	10	0	6
2021	Lanaudière	20	0	15	0
2021	Laurentides	40	0	32	0
2021	Montérégie	0	10	0	10
2021	<b>TOTAL</b>	<b>170</b>	<b>20</b>	<b>125</b>	<b>16</b>
2019-2021	<b>TOTAL</b>	<b>760</b>	<b>380</b>	<b>603</b>	<b>302</b>

## Résistance chez les agents phytopathogènes de la fraise et de la vigne

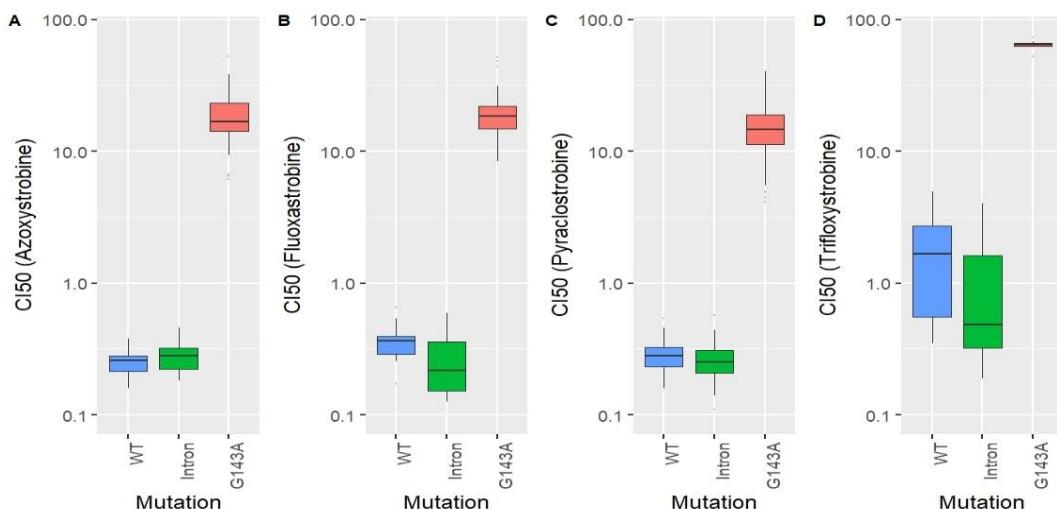
### 1. La moisissure grise (*Botrytis cinerea*)

#### 1.1. Les strobilurines

Les strobilurines (groupe 11) comprennent les ingrédients actifs et produits suivants homologués pour la fraise et la vigne : pyraclostrobine, fluoxastrobine, trifloxystrobine, mandestrobine, et azoxystrobine. Ces ingrédients actifs sont parfois mélangés à d'autres dans la composition des produits suivants : trifloxystrobine + groupe 7 (LUNA SENSATION), pyraclostrobine + groupe 7 (MERIVON, PRISTINE) et azoxystrobine + groupe 3 (QUADRIS TOP). Parmi ces matières actives, l'azoxystrobine, le fluoxastrobine, le pyraclostrobine et le trifloxystrobine ont été testés en bioessais dans le cadre du projet pour un certain nombre de souches afin de confirmer la relation phénotype-génotype. Les mêmes matières actives ont été testées à la fois pour les souches isolées de la fraise et de la vigne.

Les résultats de  $\text{Cl}_{50}$  des bioessais de résistance sont présentés ci-après sans distinction entre les cultures, l'objectif étant de vérifier la relation phénotype-génotype pour ensuite tester les souches que pour la mutation G143A conférant la résistance aux strobilurines. Ainsi, les résultats de  $\text{Cl}_{50}$  des bioessais de résistance à l'azoxystrobine des souches sensibles (wt) variaient de 0.16 à 0.46 ppm alors que les  $\text{Cl}_{50}$  des souches résistantes, sont celles portant la mutation G143A qui variaient de 6.16 à >50 ppm. Les résultats des bioessais de résistance au fluoxastrobine étaient très semblables avec des  $\text{Cl}_{50}$  variant de 0.13 à 0.67 ppm pour les souches sensibles et des  $\text{Cl}_{50}$  variant de 8.44 à >50 ppm pour les souches résistantes. Les bioessais avec le pyraclostrobine présentaient aussi des résultats allant dans ce sens avec des  $\text{Cl}_{50}$  variant de 0.19 à 0.57 ppm pour les souches sensibles et des  $\text{Cl}_{50}$  variant de 4.17 à 40.8 ppm pour les souches résistantes. Les résultats des bioessais de résistance au trifloxystrobine ont donné des résultats légèrement différents avec des  $\text{Cl}_{50}$  variant de 0.19 à 4.94 ppm pour les souches sensibles et des  $\text{Cl}_{50}$  de >50 ppm pour les souches résistantes.

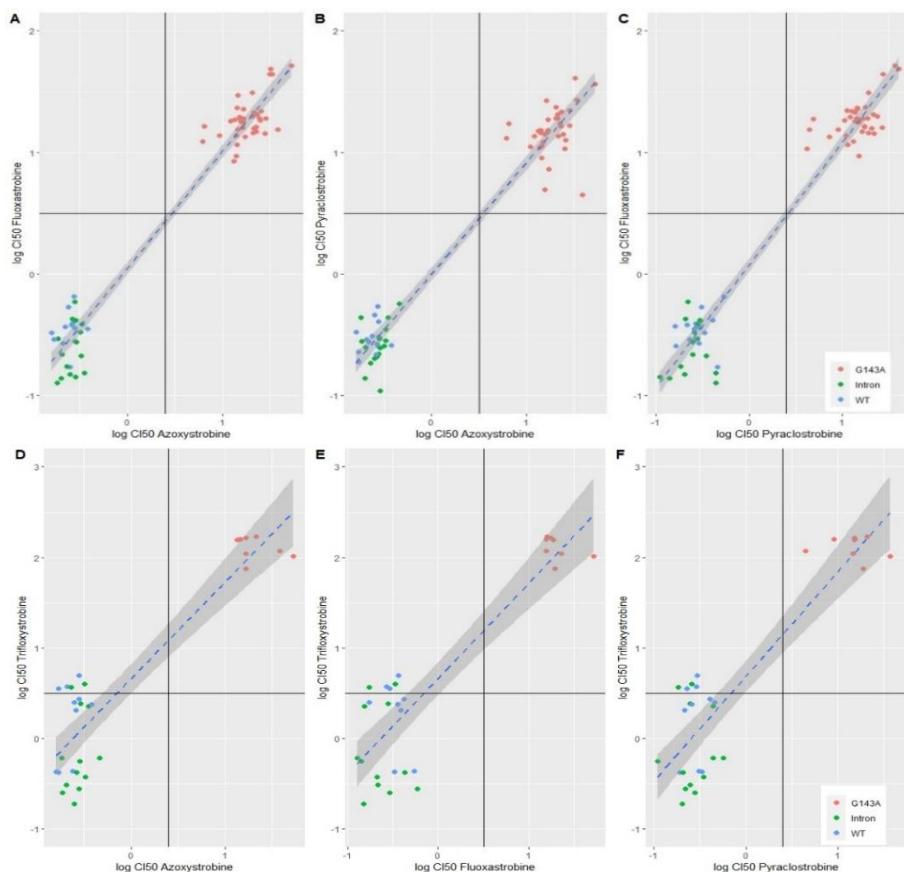
Les isolats G143A, ont en effet une  $\text{Cl}_{50}$  10 à 100 fois plus élevée que les isolats du phénotype sauvage (wt) ou ceux qui possèdent un intron à cette position (Figure 3).



**Figure 3 :** Sensibilité des isolats de *Botrytis cinerea* isolés de la fraise et de la vigne confondue en 2019-2021 et possédant ou non les principales mutations conférant une résistance aux matières actives du groupe 11. Les valeurs de  $\text{Cl}_{50}$  sont en ppm. Toutes les mutations ont été retrouvées sur le cytochrome b.

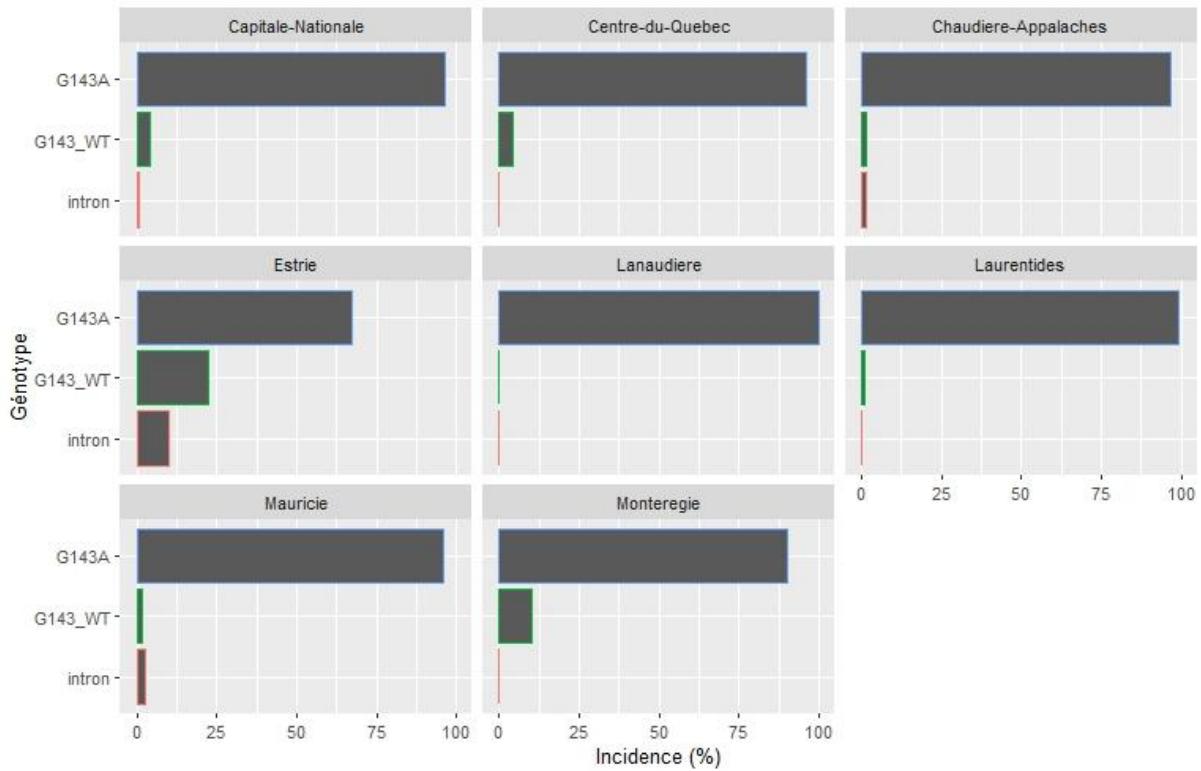
On observe également des patrons de résistance croisée entre les différentes matières actives du groupe 11 pour cette mutation. En effet, lorsque l'on compare les  $\text{Cl}_{50}$ , obtenues en bioessais, on observe une forte corrélation entre les  $\text{Cl}_{50}$  obtenues pour certaines paires de matières actives à l'étude ( $R^2 = 0.96$ ,  $0.95$  et  $0.95$ , pour les paires azoxystrobine-fluoxastrobine, azoxystrobine-pyraclostrobine et pyraclostrobine-fluoxastrobine, respectivement), mais une corrélation moins forte entre les  $\text{Cl}_{50}$  obtenus pour les paires impliquant le trifloxystrobine ( $R^2 = 0.82$ ,  $0.79$  et  $0.79$ , pour les paires trifloxystrobine-azoxystrobine, trifloxystrobine-fluoxastrobine et trifloxystrobine-pyraclostrobine, respectivement) (Figure 4). Les pentes des droites de régression ne sont pas significativement différentes de 1 ( $m = 1.0$ ,  $1.04$  et  $0.95$ ) pour les paires azoxystrobine-fluoxastrobine, azoxystrobine-pyraclostrobine et pyraclostrobine-fluoxastrobine, respectivement, ce qui suggère que la réponse des isolats de type mutant (G143A) et de type sauvage (wt) est similaire pour ces matières actives. Les pentes des droites de régression pour les paires avec le trifloxystrobine sont respectivement de  $m = 0.77$ ,  $0.76$  et  $0.69$  pour les paires trifloxystrobine-

azoxystrobine, trifloxystrobine-fluoxastrobine et trifloxystrobine-pyraclostrobine. Les valeurs de  $\text{CI}_{50}$  sont beaucoup plus élevées pour le trifloxystrobine (moyenne au-delà de 100 ppm) que pour l'azoxystrobine, le fluoxastrobine et le pyraclostrobine (moyennes de 19.74, 20.57 et 16.03 ppm respectivement). Le facteur de résistance de 10 à 100 est toutefois respecté entre les  $\text{CI}_{50}$  des isolats G143A et des isolats wt ou possédant un intron pour le trifloxystrobine (Figure 4). Le fait que les  $\text{CI}_{50}$  des souches soient plus élevées pour le trifloxystrobine que pour les autres strobilurines testées est difficilement explicable et ne concorde pas avec les résultats obtenus par Weber et Hahn (2011), étude dans laquelle l'inverse a été observé. Il pourrait s'agir d'une question de méthodologie ou de choix de milieux de culture, des tests supplémentaires seraient nécessaires pour bien comprendre cette différence.

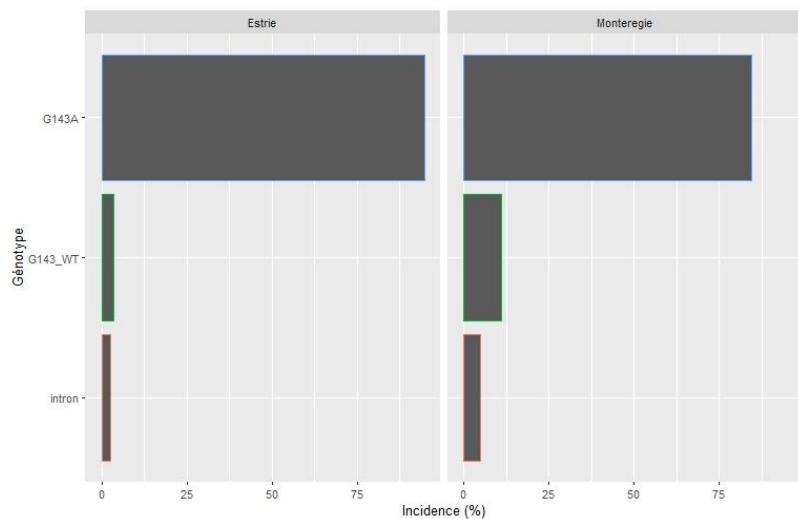


**Figure 4:** Patrons de résistance croisée observés par paire pour quatre fongicides du groupe 11, en A) azoxystrobine et fluoxastrobine, en B) azoxystrobine et pyraclostrobine, en C) pyraclostrobine et fluoxastrobine, en D) azoxystrobine et trifloxystrobine, en E) fluoxastrobine et trifloxystrobine et en F) pyraclostrobine et trifloxystrobine. Les points bleus représentent les isolats ne possédant pas la mutation G143A, les points verts représentent les isolats possédant un intron et les points rouges représentent les isolats possédant la mutation.

Les proportions d'isolats possédant la mutation conférant la résistance aux strobilurines sont extrêmement élevées dans toutes les régions du Québec. En effet, la proportion d'isolats porteurs de cette substitution varie de 67% à 100% selon la culture et la région (Tableau 2). En effet, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet suggèrent des niveaux de résistance élevés aux strobilurines dans la fraise et dans la vigne, soit 93.5% dans la fraise et 90.1% dans la vigne (Figure 2a et 2b).



**Figure 2a:** Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 11 effectués sur les souches 2019-2021 de *B. cinerea* isolées de la fraise pour chaque région échantillonnée. Le génotype G143A est associé à une résistance multiple aux fongicides du groupe 11, alors que les génotypes G143\_wt et porteurs d'intron sont sensibles.



**Figure 2b:** Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 11 effectués sur les souches 2029-2021 de *B. cinerea* isolées de la vigne pour chaque région échantillonnée. Le génotype G143A est associé à une résistance multiple aux fongicides du groupe 11, alors que les génotypes G143\_wt et porteurs d'intron sont sensibles.

**Tableau 2.** Synthèse du pourcentage des mutations détectées chez les souches de *Botrytis cinerea* testées entre 2019 et 2021

FRAC	Mutations	Capitale-	Centre-du-	Chaudière-	Estrie		Lanaudière	Laurentides	Mauricie	Montérégie
		Nationale	Québec	Appalaches	Frais	Fraise	Fraise	Vigne	Fraise	Fraise
11	G143A	96,5	95,9	97,0	67,2	94,8	100	99,0	95,6	90,0
	Intron	0,5	0,0	1,5	10,3	2,4	0,0	0,0	2,9	0,0
	WT	3	4,1	1,5	22,4	3,6	0,0	1,0	1,5	10,0
7	H272R	6,9	22,5	6,1	55,2	51,7	53,3	12,6	20,8	16,0
	H272V	0,5	2,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	H272Y	0,5	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	2,2	4,0
	N230I	81,2	61,2	87,7	10,3	14,4	33,3	73,8	35,4	66,0
	P225F	3,0	6,1	3,1	0,0	20,1	6,7	5,8	15,7	4,0
	P225H	0,0	0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,6	0,0
	WT	7,9	8,2	3,1	34,5	10,9	6,7	7,8	25,3	10,0
17	F412C	0,0	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	F412I	5,0	8,2	4,6	1,7	2,3	0,0	7,8	5,1	2,0
	F412S	51,2	32,7	46,2	27,6	11,5	73,3	50,5	15,8	36,0
	F412V	8,5	2,0	13,8	3,4	1,1	0,0	11,6	1,7	4,0
	WT	35,3	57,1	35,4	65,5	85,1	26,7	30,1	77,4	58,0
2	I365N	74,3	69,4	73,9	37,9	16,1	66,7	73,8	30,9	64,0
	I365S	12,4	12,2	21,5	20,7	13,2	20,0	20,4	18,0	24,0
	Q369P	0,5	0,0	0,0	1,7	16,7	0,0	0,0	15,7	0,0
	WT	12,9	18,4	4,6	39,7	54,0	13,3	5,8	35,4	12,0
										44,5

0

1       1.2 *Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase*

2       Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (groupe 7) comprennent les ingrédients  
3 actifs homologués pour la fraise et la vigne : boscalide; penthiopyrade, isofétamide ;  
4 fluxapyroxade ; et fluopyram. Ces ingrédients actifs sont parfois mélangés à d'autres dans la  
5 composition des produits suivants : fluopyram + groupe 11 (LUNA SENSATION),  
6 fluxapyroxade + groupe 11 (MERIVON), pydiflumétofène + groupe 12 (MIRAVIS PRIME) et  
7 boscalide + groupe 11 (PRISTINE). Parmi ces matières actives, le boscalide, le fluopyram, le  
8 fluxapyroxad et le pydiflumétofène ont été testés en bioessais dans le cadre du projet pour un  
9 certain nombre de souches afin de confirmer la relation phénotype-génotype. Les mêmes  
10 matières actives ont été testées à la fois pour les souches isolées de la fraise et de la vigne.

11     La résistance aux matières actives du groupe 7 est également associée à la présence de  
12 mutations, cette fois sur le gène *sdh* codant pour la succinate déshydrogénase. Cependant,  
13 contrairement à la résistance au groupe 11, la résistance aux fongicides du groupe 7 est  
14 associée à au moins 11 mutations, certaines conférant une résistance à une seule matière  
15 active alors que d'autres confèrent une résistance croisée à différentes matières actives du  
16 groupe. La plupart de ces mutations sont situées sur la sous-unité B (H272Y/R/L/V,  
17 P225L/T/F/H et N230I), mais la littérature scientifique rapporte également la présence de  
18 mutations sur la sous-unité C (H132R et A85V) de la succinate déshydrogénase. Dans le cadre  
19 de ce projet, six mutations ont été retrouvées, bien que la présence de trois d'entre elles soit  
20 anecdotique (H272V = 0.44%, H272Y = 0.78% et P225H = 0.22%). Les mutations les plus  
21 représentées dans le cadre de l'inventaire étaient N230I (51.3%), H272R (24.1%) et P225F  
22 (9.4%) (Tableau 2, figures 8a et 8b). La mutation N230I semble être prédominante dans toutes  
23 les régions du Québec, sauf en Estrie où la mutation H272R est prédominante.

24     Les résultats des bioessais ont démontré que les souches sauvages avaient une  $Cl_{50}$   
25 moyenne de 0.3, 1.2, 0.2 et 0.06 ppm pour le boscalide, le fluopyram, le fluxapyroxad et le  
26 pydiflumétofène respectivement. De leur côté, les isolats ayant la mutation H272R avaient des  
27  $Cl_{50}$  moyennes de 9.2, 0.9, 0.6 et 0.3 ppm pour les quatre mêmes fongicides, tandis que les  
28 isolats H272Y avaient des  $Cl_{50}$  moyennes de 6.2, 1.1, 1.4 et 0.5 ppm. Ainsi, ces deux mutations  
29 (H272R et H272Y) confèrent une résistance au boscalide, mais pas nécessairement aux  
30 autres fongicides du même groupe. Au contraire, les isolats N230I avaient une  $Cl_{50}$  moyenne  
31 de 15.6, 10.1, 13.6 et 0.7 ppm pour le boscalide, le fluopyram, le fluxapyroxad et le  
32 pydiflumétofène respectivement. Les  $Cl_{50}$  observées pour les isolats N230I sont environ 10  
33 fois plus élevées que pour les génotypes sauvages. Cette mutation semble donc conférer une  
34 résistance aux quatre ingrédients actifs testés. Enfin, les isolats ayant la mutation P225F  
35 avaient une  $Cl_{50}$  moyenne de 43.2, 27.4, 72.1 et 0.9 ppm pour le boscalide, le fluopyram, le  
36 fluxapyroxad et le pydiflumétofène respectivement. Cette mutation semble donc elle aussi  
37 conférer une résistance aux quatre fongicides testés (Figure 5).

38

39

40

41

42

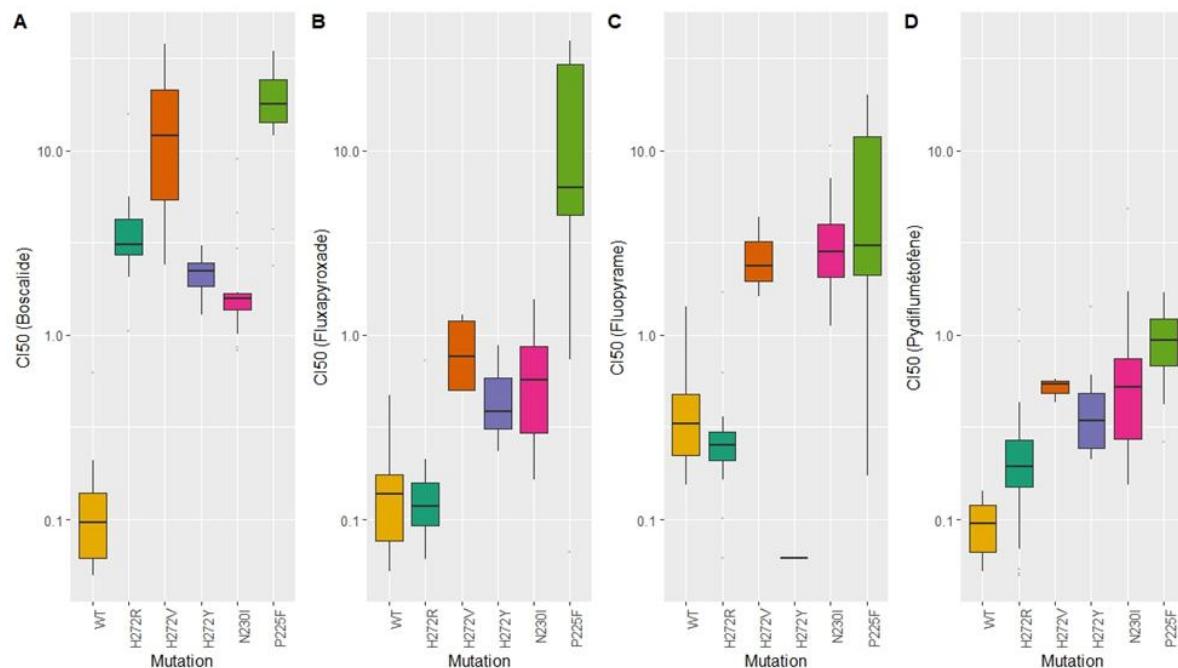
43

44

45 **Tableau 3.** Sensibilité des isolats de *B. cinerea* portant les différentes mutations sur la sous-unité  
 46 b du gène *sdh* qui confèrent de la résistance aux SDHIs en termes de plages de valeurs de  $\text{Cl}_{50}$   
 47 (ppm) et de facteurs de résistance (FR)

Mutation	Fongicides							
	Boscalide		Fluopyram		Fluxapyroxad		Pydiflumétofène	
	$\text{Cl}_{50}$	FR	$\text{Cl}_{50}$	FR	$\text{Cl}_{50}$	FR	$\text{Cl}_{50}$	FR
Sensible	0.04-0.21	s.o.	0.004-0.56	s.o.	0.003-0.47	s.o.	0.01-0.14	s.o.
H272R	1.06-15.85	8.48-126.8	0.06-1.71	0.2-6.1	0.04-0.72	0.2-3.0	0.05-1.38	0.7-18.4
H272V	2.40- >50	19.2->400	1.61-4.36	5.7-15.5	0.50-1.29	2.1-5.4	0.43-0.58	5.7-7.7
H272Y	1.30-3.07	10.4-245.6	0.02-0.06	0.1-0.2	0.23-0.88	1.0-3.7	0.21-1.42	2.8-18.9
N230I	0.82-8.97	6.6-71.8	1.13-10.66	4.0-37.8	0.16-1.56	0.7-6.6	0.15-4.82	2.0-64.3
P225F	3.76-43.30	30.1-346.4	1.09-20.00	3.9-70.9	3.62- >50	15.3->211	0.26-1.70	3.5-22.7

48



49

50

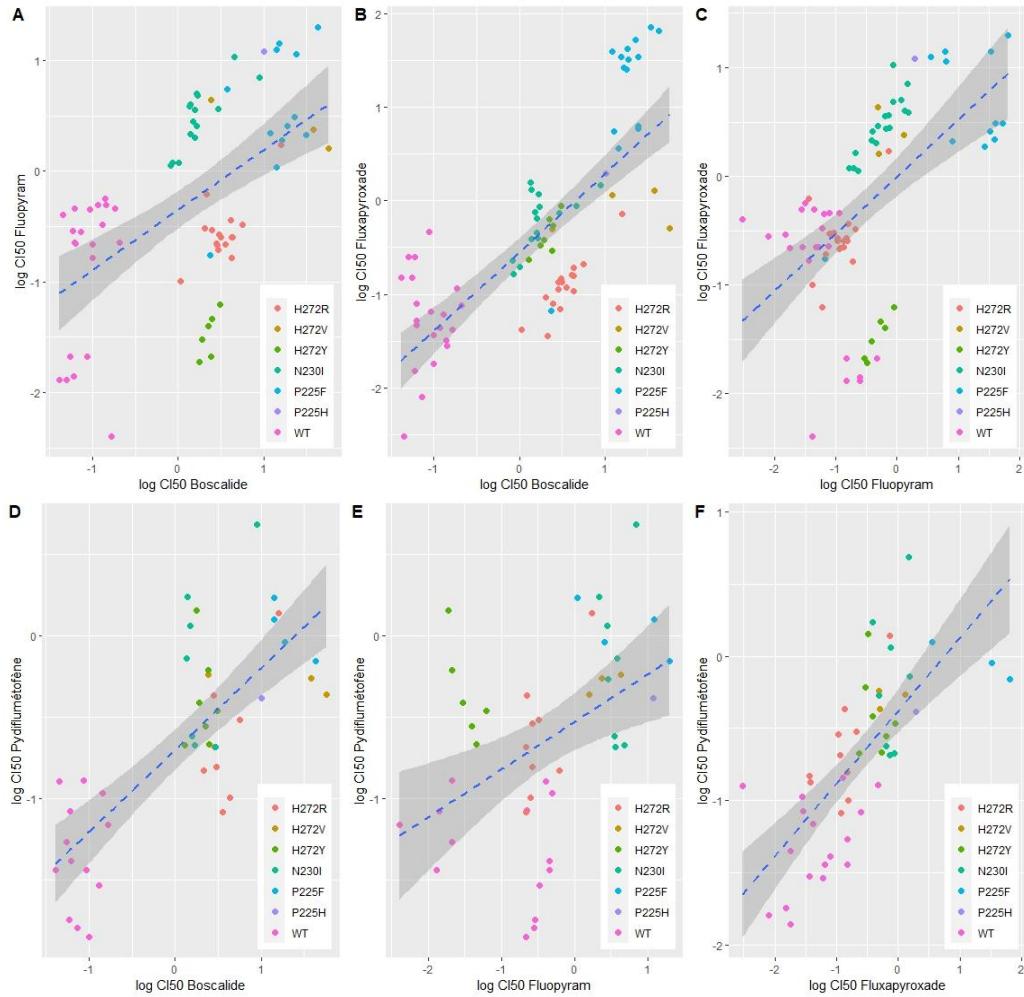
51 **Figure 5:** Sensibilité des isolats de *Botrytis cinerea* isolés en 2019-2021 de la fraise et de la vigne  
 52 confondus possédant ou non les principales mutations conférant une résistance aux matières  
 53 actives du groupe 7. Les valeurs de  $\text{Cl}_{50}$  sont en ppm. Toutes les mutations ont été retrouvées sur  
 54 la sous-unité B de la succinate déshydrogénase.

55

56 Des patrons de résistance croisés existent également pour les matières actives du  
 57 groupe 7. Cependant, ceux-ci ne sont pas clairs lorsque les analyses de régression sont  
 58 réalisées avec tous les génotypes. En effet, lorsque les génotypes H272R/V/Y sont inclus, les  
 59 coefficients de détermination sont faibles pour toutes les paires ( $R^2 = 0.29, 0.56, 0.31, 0.57,$   
 60  $0.18$  et  $0.51$  pour les paires boscalide-fluopyram, boscalide-fluxapyroxad, fluopyram-  
 2023

fluxapyroxad, pydiflumétofène-boscalide, pydiflumétofène-fluopyram et pydiflumetofène-fluxapyroxad respectivement) (Figure 6). Cependant, lorsque l'on réalise les mêmes analyses sans les génotypes H272R/V/Y, on constate que les patrons de résistance croisée sont plus forts ( $R^2 = 0.62, 0.79, 0.37, 0.69, 0.40, 0.55$  pour les paires boscalide-fluopyram, boscalide-fluxapyroxad, fluopyram-fluxapyroxad, pydiflumétofène-boscalide, pydiflumétofène-fluopyram et pydiflumétofène-fluxapyroxad respectivement) (Figure 7).

67



68

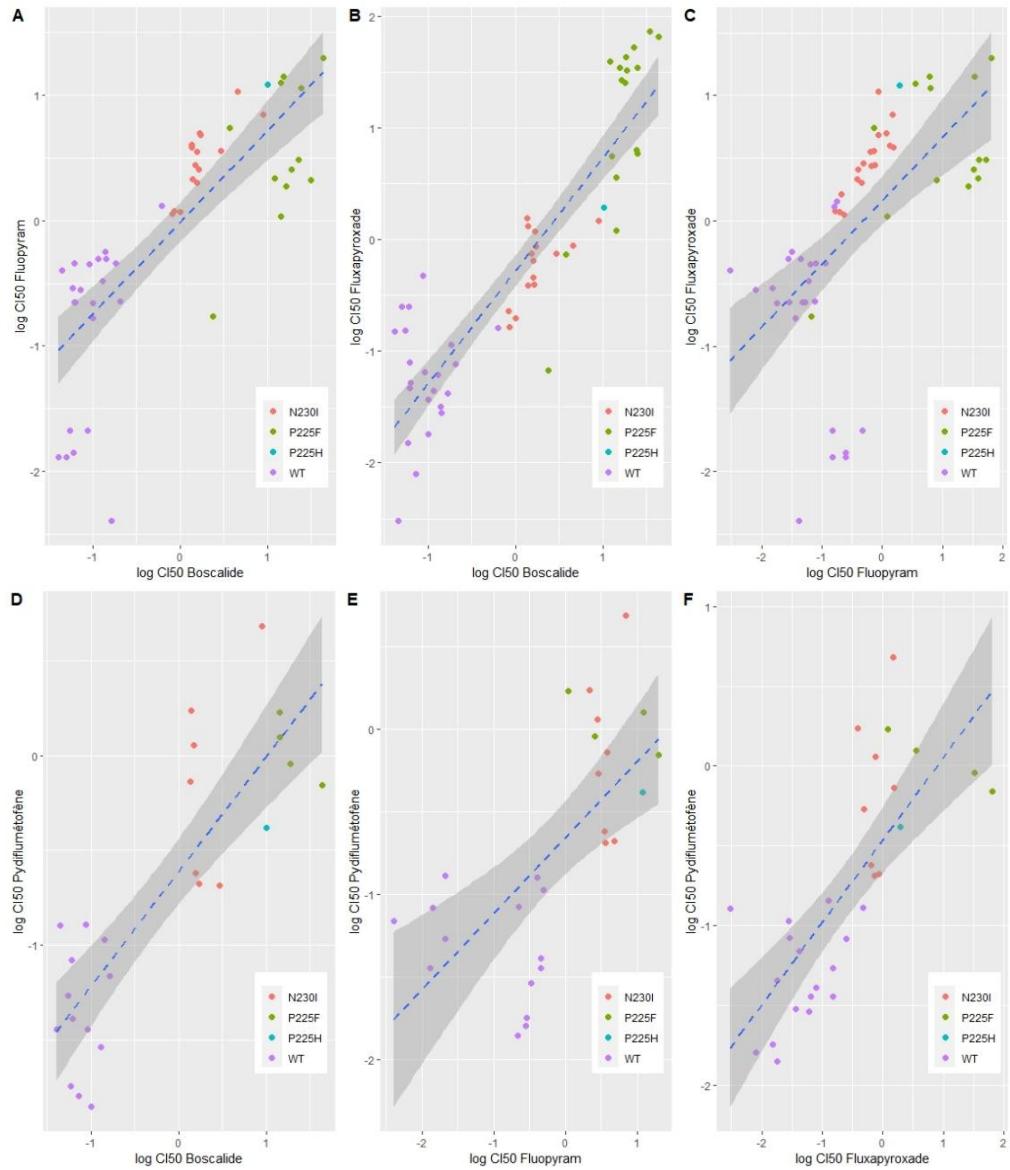
69

70

71 **Figure 6:** Patrons de résistance croisée observés sur les souches isolées de la fraise et de la vigne  
 72 confondues et ce par paire pour quatre fongicides du groupe 7 : A) boscalide-fluopyram, B)  
 73 boscalide-fluxapyroxad, C) fluopyram-fluxapyroxad, D) pydiflumétofène-boscalide, E)  
 74 pydiflumétofène-fluopyram et F) pydiflumétofène-fluxapyroxad.

75

76

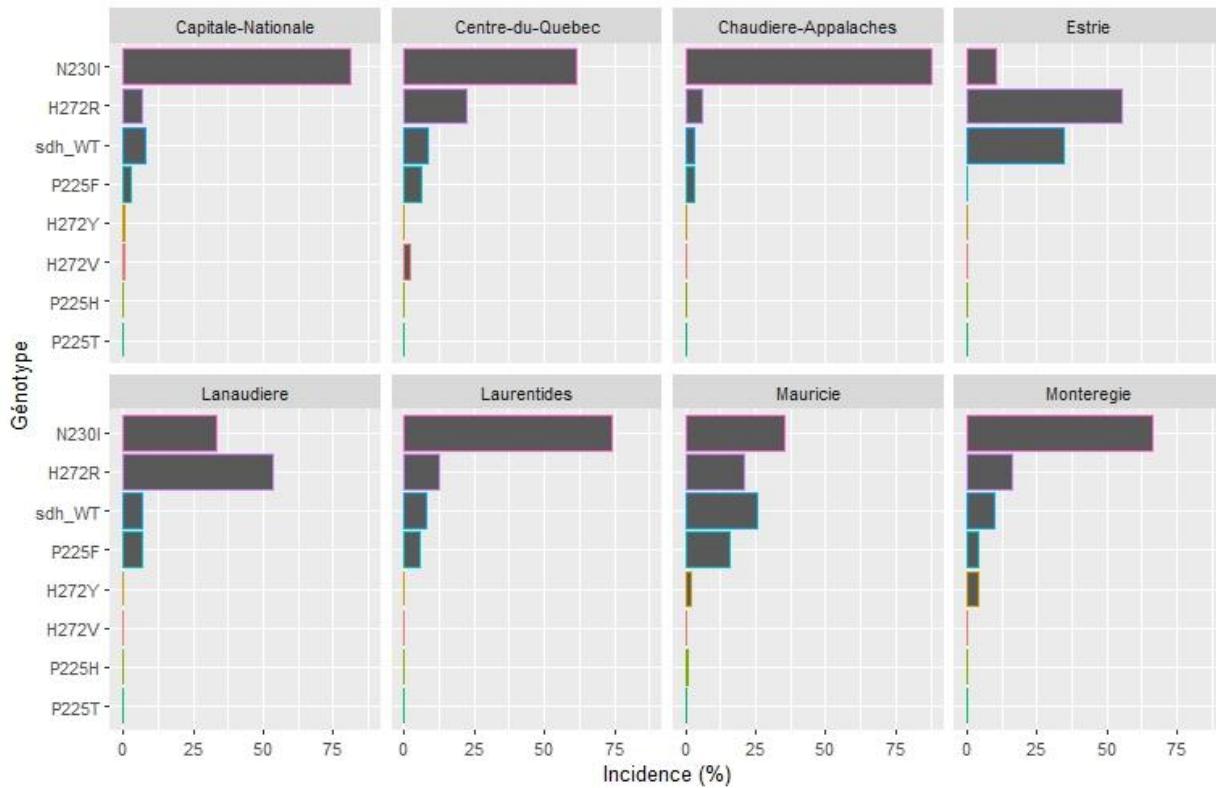


77

78

79

80 **Figure 7:** Patrons de résistance croisée observés sur les souches isolées de la fraise et de la vigne  
 81 confondues et ce par paire pour trois fongicides du groupe 7 : A) boscalide-fluopyram, B)  
 82 boscalide-fluxapyroxad, C) fluopyram-fluxapyroxad, D) pydiflumétofène-boscalide, E)  
 83 pydiflumétofène-fluopyram et F) pydiflumétofène-fluxapyroxad. Les analyses de régression ont été faites sans les génotypes  
 84 H272/R/V/Y.

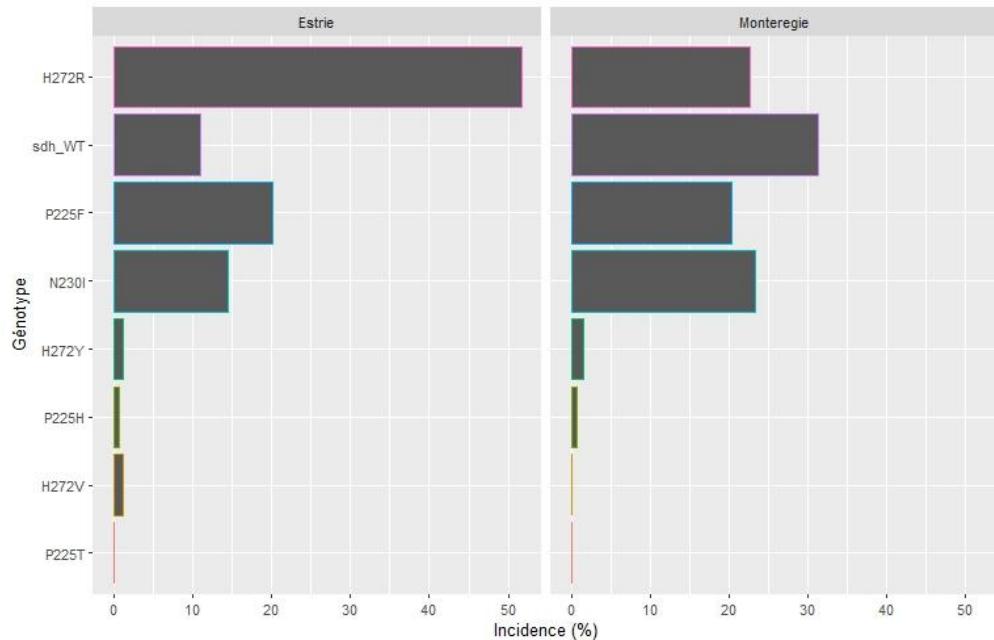


85

86 **Figure 8a:** Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 7 effectués sur les souches 2019-  
87 2021 de *B. cinerea* isolés de la fraise pour chaque région échantillonnée.

88

89



90

91 **Figure 8b:** Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 7 effectués sur les souches 2019-  
92 2021 de *B. cinerea* isolés de la vigne pour chaque région échantillonnée.

93

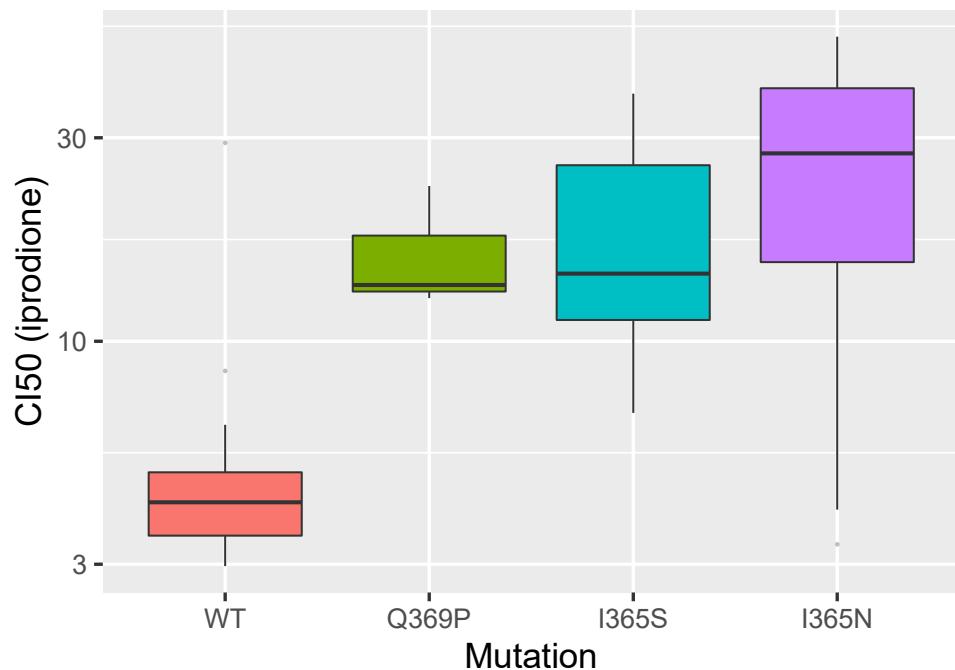
94 1.3 Les dicaboximides

95 Pour la fraise et la vigne, il n'y a plus de produits du groupe 2 d'homologués, ROVRAL  
96 contenant de l'iprodione était autrefois utilisé d'où l'intérêt de vérifier la résistance des souches  
97 à cette matière active. La résistance à l'iprodione est associée à des mutations présentes sur  
98 le gène Os-1, codant pour une histidine kinase. On rapporte quatre mutations, soit : I365S/N,  
99 Q369H et la double mutation Q369P – N373S. Trois d'entre elles ont été retrouvées dans le  
100 cadre de ce projet (Q369P-N373S (7%), I365S (17%) et I365N (51%)) (Tableau 2). De façon  
101 générale, la mutation I365N est prédominante dans la plupart des régions sauf en Estrie et en  
102 Mauricie où c'est le génotype sauvage qui est prédominant (Figures 10a et 10b). Dans le cas  
103 du groupe 2, les isolats n'ayant aucune mutation avaient une  $CI_{50}$  moyenne de 5.4 ppm, tandis  
104 que les isolats ayant les mutations Q369P-N373S, I365S et I365N avaient une  $CI_{50}$  moyenne  
105 de 16.4, 19.4 et 27.1 ppm, respectivement.

106

107

108

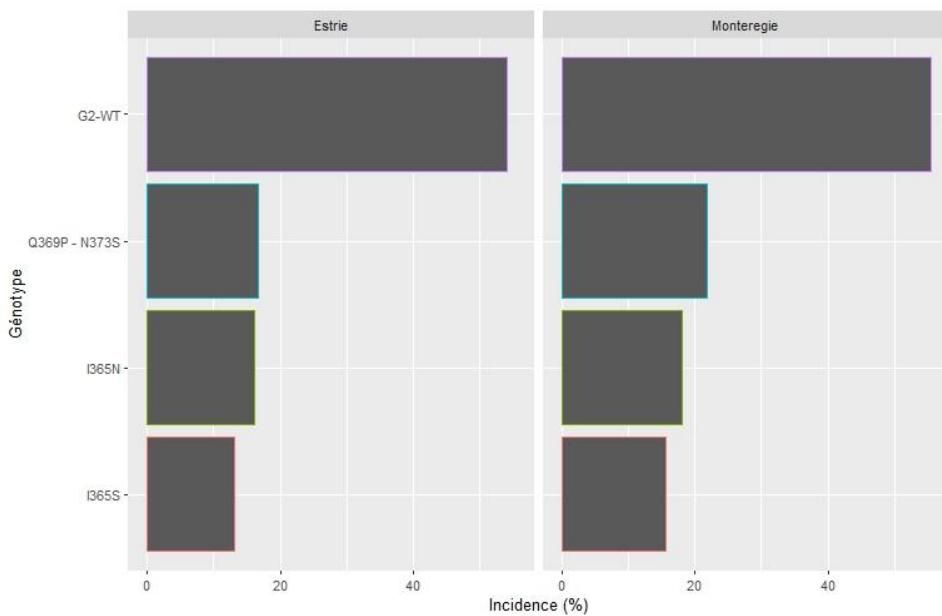
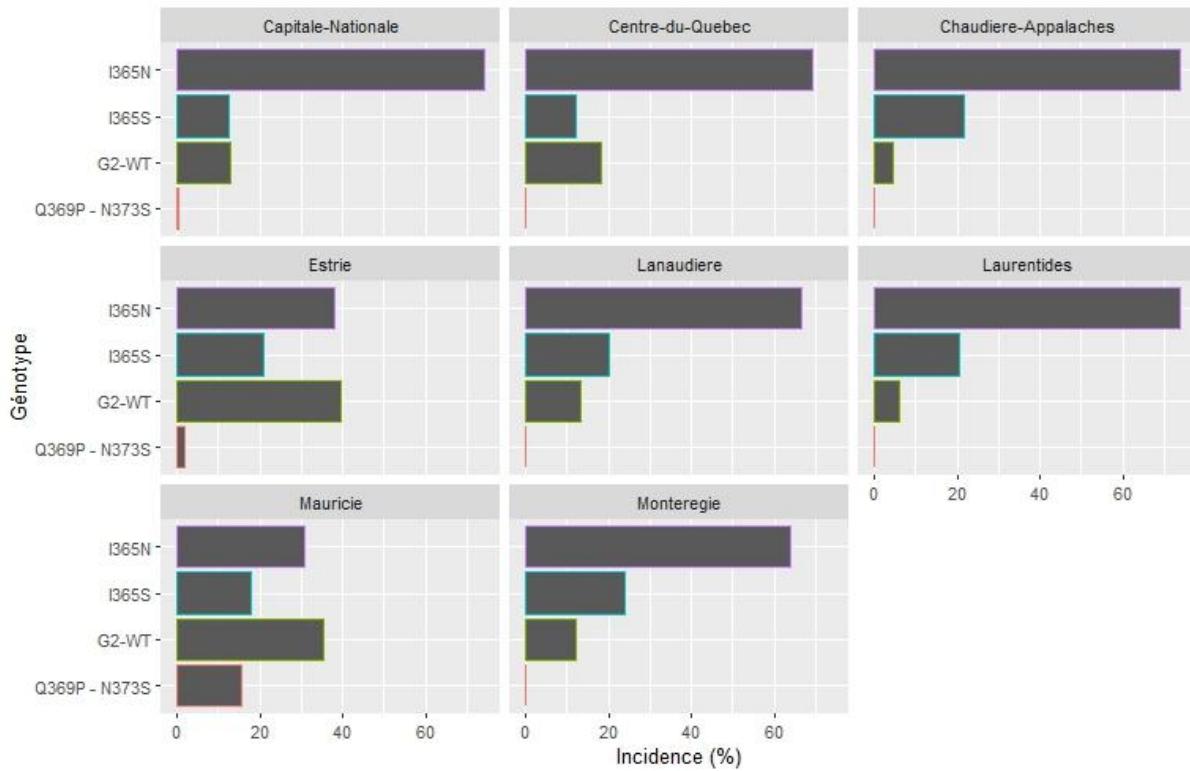


109

110 **Figure 9 :** Sensibilité des isolats de *Botrytis cinerea* isolés en 2019-2021 de la fraise et de la vigne  
111 confondus possédant ou non les principales mutations conférant une résistance à l'iprodione  
112 (groupe 2) Les valeurs de  $CI_{50}$  sont en ppm.

113

114



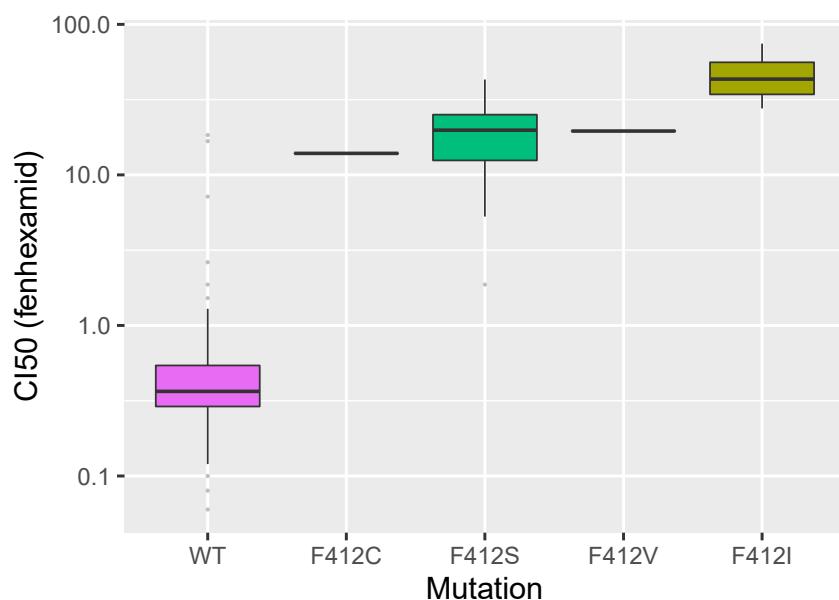
125    1.4 Les inhibiteurs de la kéto réductase

126       Le groupe 17 comprend principalement l'ingrédient actif et le produit suivant  
127 homologué pour la fraise et la vigne : fenhexamide (ex : ELEVATE). La résistance au  
128 fenhexamide (groupe 17) peut être associée à six mutations différentes au sein du gène *erg27*,  
129 qui code pour la 3-cétoréductase, causant une substitution aux positions 63 (T63I), 412  
130 (F412I/S/V/C) et 496 (T496R). Dans le cadre de ce projet, quatre de ces mutations ont été  
131 retrouvées : F412I (4.9%), F412S (33.1%), F412C (0.1%) et F412V (5.1%) (Figure 11). La  
132 mutation la plus représentée dans le cadre de l'inventaire était la F412S, le génotype sauvage  
133 était toutefois prédominant en Estrie, dans le Centre-du-Québec, en Mauricie et en Montérégie  
134 (Figures 12a et 12b). Pour le fenhexamid, les souches n'ayant aucune mutation avaient une  
135  $CI_{50}$  moyenne de 0.75 ppm, tandis que les isolats ayant les mutations F412C, F412I, F412S et  
136 F412V avaient des  $CI_{50}$  moyennes de 13.9, 47.5, 19.3 et 19.6 ppm, respectivement (Figure  
137 11).

138

139

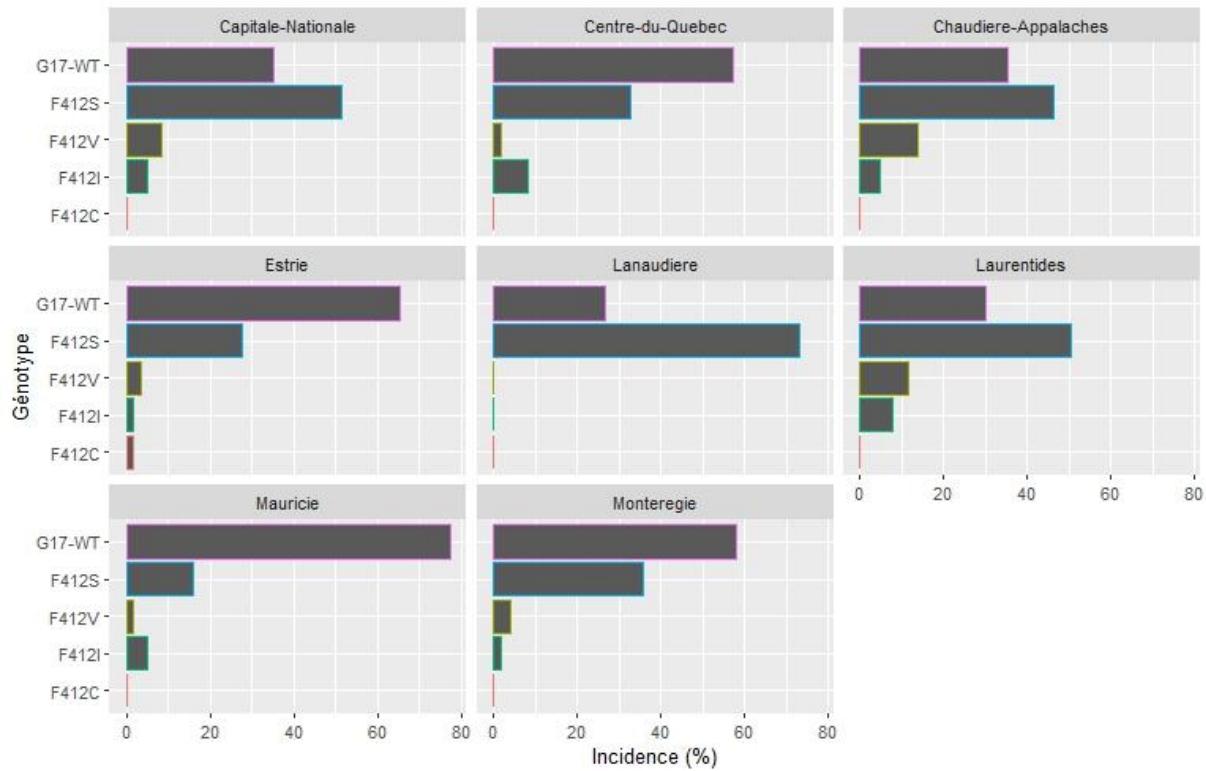
140



141       **Figure 11 :** Sensibilité des isolats 2029-2021 de *B. cinerea* isolés de la fraise et de la vigne  
142 confondue possédant ou non les principales mutations conférant une résistance aux matières  
143 actives du groupe 17. Les valeurs de  $CI_{50}$  sont en ppm.

144

145



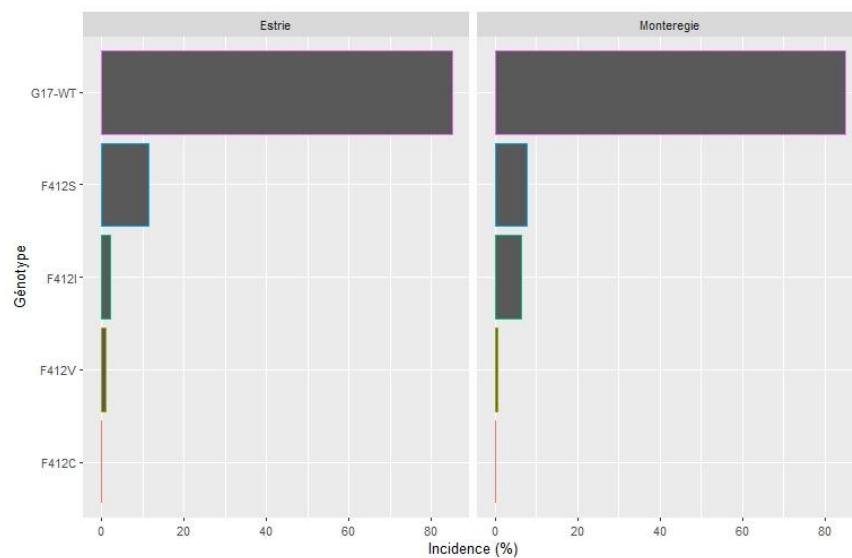
146

147

148 **Figure 12a:** Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 17 effectués sur les souches  
149 2019-2021 de *B. cinerea* isolées de la fraise pour chaque région échantillonnée.

150

151



152

153

154 **Figure 12b:** Résultats des tests moléculaires de résistance au groupe 17 effectués sur les souches  
155 2019-2021 de *B. cinerea* isolés de la vigne pour chaque région échantillonnée.

156

157

158

159 *1.5 les anilinopyrimidines et les phénylpyrrolos*

160 Les groupes 9 et 12 sont composés des ingrédients actifs homologués pour la fraise et la  
161 vigne: pyriméthanil (9) et fludioxonil (12) (SCHOLAR). Ces ingrédients actifs entrent également  
162 dans la composition des produits en mélange suivants : cyprodinil (9) + groupe 3 (INSPIRE  
163 SUPER), pyriméthanil (9) + groupe 7 (LUNA TRANQUILITY), cyprodinil (9) + fludioxonil (12)  
164 (SWITCH). Les mêmes matières actives ont été testées à la fois pour les souches isolées de  
165 la fraise et de la vigne.

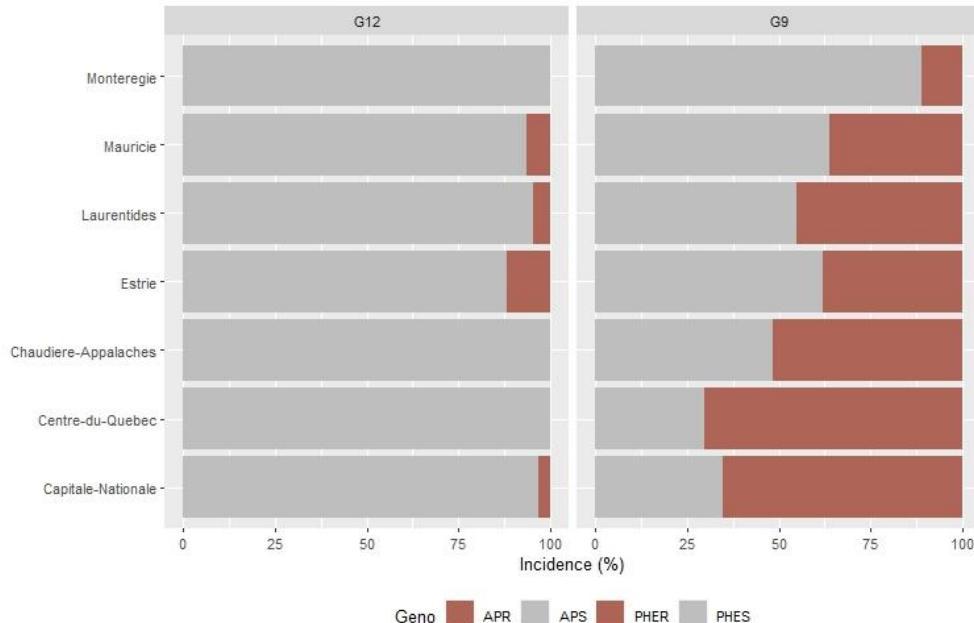
166 Dans le cadre du présent inventaire, les niveaux de résistance aux anilinopyrimidines  
167 (groupe 9 : cyprodinile et pyriméthanile) variaient entre 23% et 71% en fonction des régions et  
168 des cultures (moyenne de 49%). Basé sur Fernandez-Ortuño et al. 2014, il a été déterminé  
169 que les souches étaient considérées résistantes lorsqu'il y avait croissance à la dose  
170 discriminante de 4 ppm.

171 Pour le cyprodinile, les  $\text{Cl}_{50}$  obtenues lors des bio essais de germination de spores variaient  
172 de 0.3 à >50 ppm (moyenne 22.6 ppm) dans la fraise conventionnelle (variétés non  
173 remontantes), de 0.9 à >50 ppm (moyenne 17.8 ppm) pour la fraise à jours neutres (variétés  
174 remontantes) et de 0.4 à >50 ppm (moyenne 12.1 ppm) pour la vigne (Figure 15).

175 Pour le pyriméthanile, les  $\text{Cl}_{50}$  variaient de 0.4 à >50 ppm (moyenne 8.2 ppm) dans la fraise  
176 conventionnelle, de 0.5 à 25.2 ppm (moyenne 8.7 ppm) pour la fraise à jours neutres et de 0.4  
177 à >50 ppm (moyenne 6.3 ppm) pour la vigne (Figure 14).

178 Les niveaux de résistance observés pour les phenylpyrroles (groupe 12, fludioxonile)  
179 étaient pour leur part très bas. Elles variaient entre 0 et 12% (moyenne 4%) dépendamment  
180 des régions (Figure 13a, 13b). La dose permettant de séparer les souches résistantes des  
181 souches sensibles a été établie à 0.5 ppm et ce toujours selon les doses discriminantes  
182 établies par Fernandez-Ortuño et al. 2014. Pour le fludioxonile, les  $\text{Cl}_{50}$  variaient de 0.04 à  
183 40.3 ppm (moyenne 1.2 ppm) dans la fraise conventionnelle, de 0.04 à 11.3 ppm (moyenne  
184 0.6 ppm) pour la fraise à jours neutres et de 0.03 à 9.5 ppm (moyenne 0.3 ppm) pour la vigne  
185 (Figure 16).

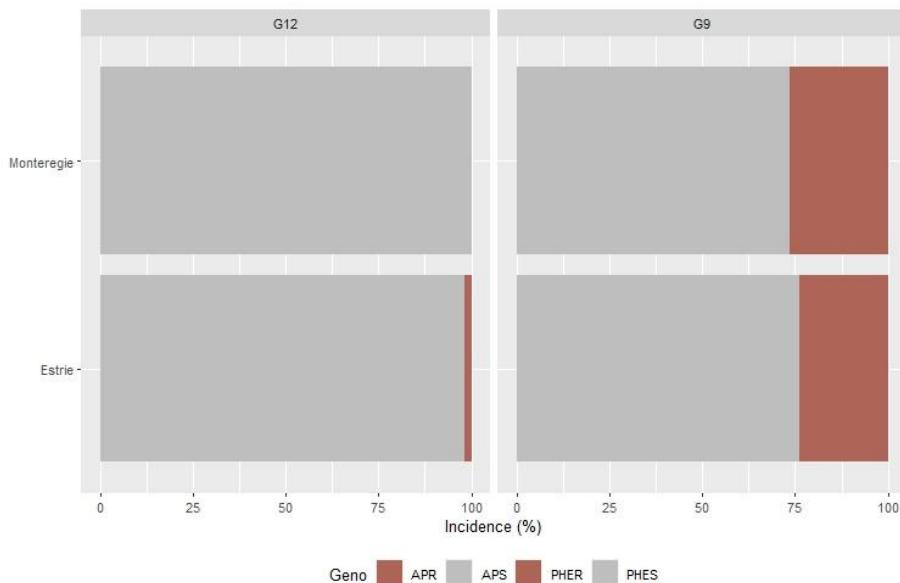
186



187

188 **Figure 13a:** Résultats des bioessais de germination de spores effectués sur les souches 2019-2021  
189 de *B. cinerea* isolées de la fraise pour chaque région échantillonnée pour leur résistance aux  
190 anilinopyrimidines (G9) (APR : pourcentage de souches présentant un phénotype résistant, APS :  
191 pourcentage de souches présentant un phénotype sensible et aux phénylpyrroles (G12) (PHER :  
192 pourcentage de souches présentant un phénotype résistant, PHES : pourcentage de souches  
193 présentant un phénotype sensible).

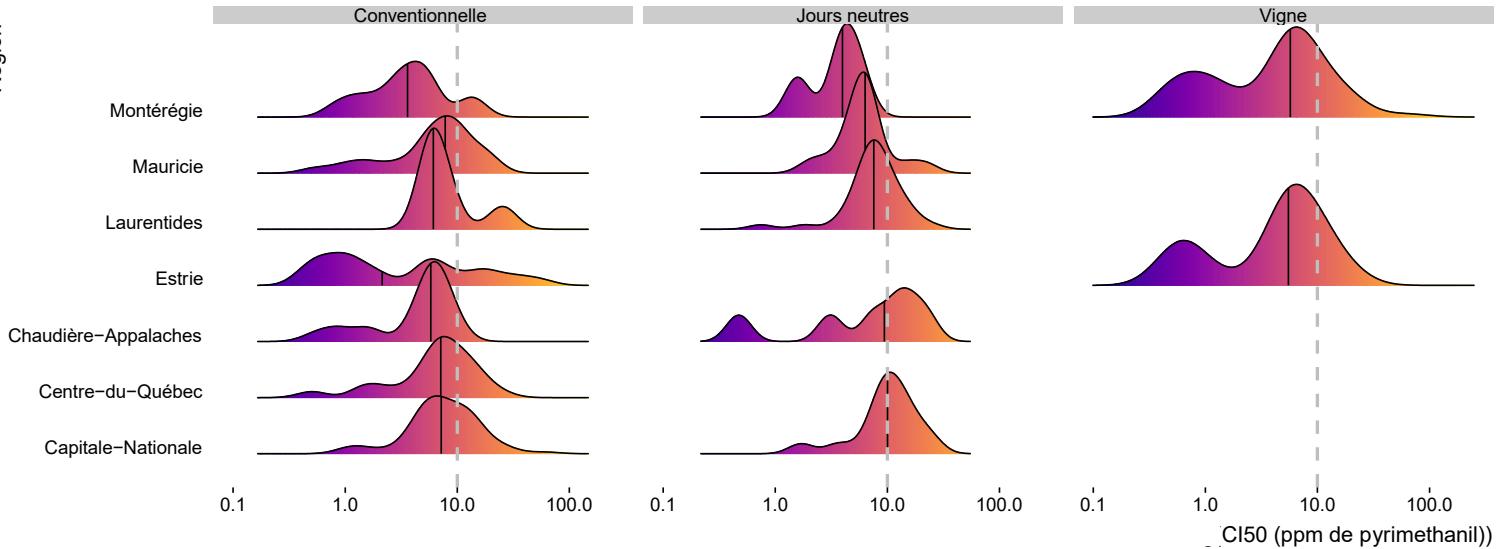
194



195

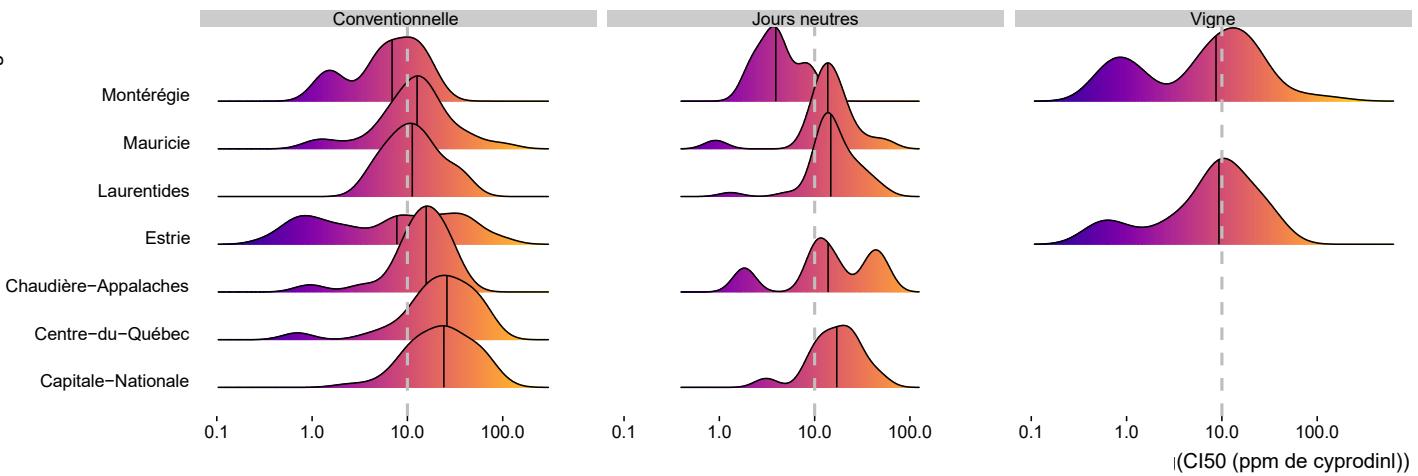
196 **Figure 13b:** Résultats des bioessais de germination de spores effectués sur les souches 2019-2021  
197 de *B. cinerea* isolés de la vigne pour chaque région échantillonnée pour leur résistance aux  
198 anilinopyrimidines (G9) (APR : pourcentage de souches présentant un phénotype résistant, APS :  
199 pourcentage de souches présentant un phénotype sensible et aux phénylpyrroles (G12) (PHER :  
200 pourcentage de souches présentant un phénotype résistant, PHES : pourcentage de souches  
201 présentant un phénotype sensible).

Région

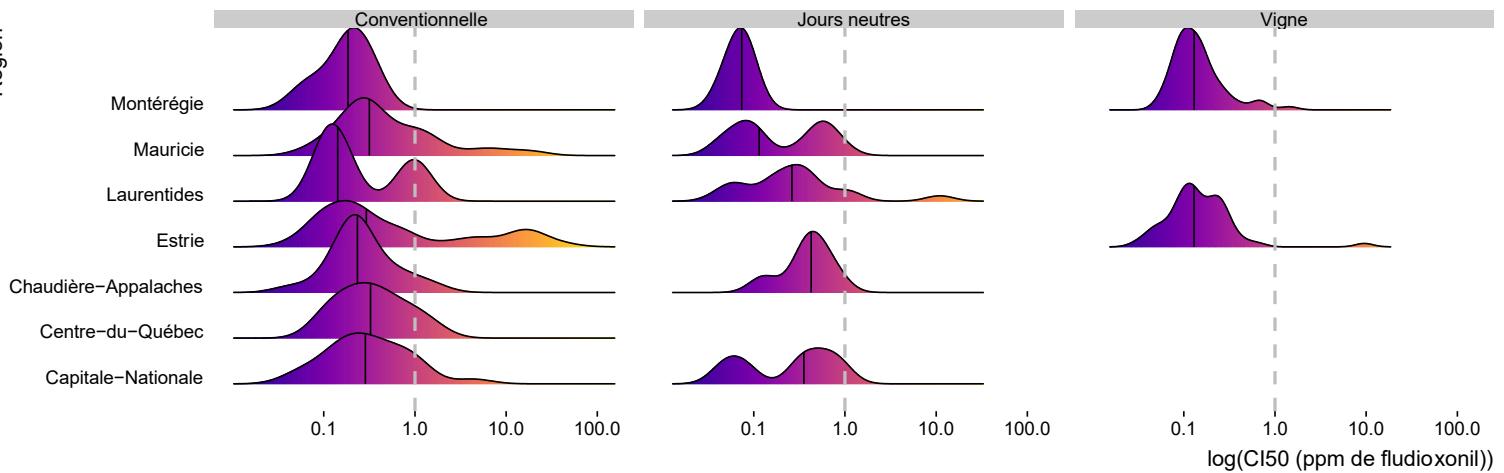


202      **Figure 14:** Distribution des  $CI_{50}$  pour *B. cinerea* au pyriméthanile pour chacune des régions et pour  
 203      la fraise conventionnelle, la fraise à jours neutres et la vigne. L'axe des x représente les  $CI_{50}$  alors  
 204      que l'axe des y présente l'abondance associée à chacune de ces valeurs de  $CI_{50}$   
 205

Région



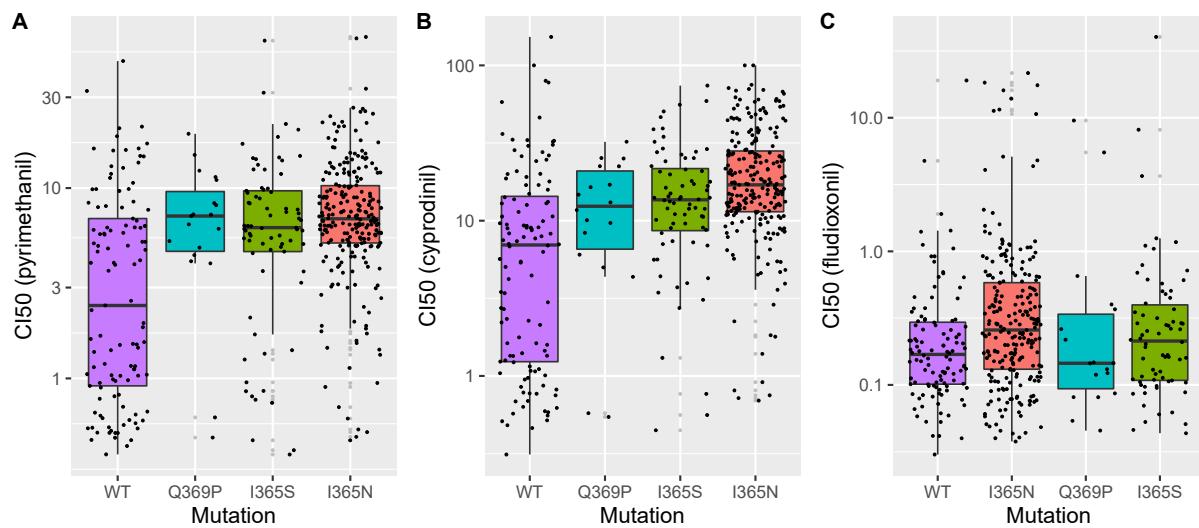
206      **Figure 15:** Distribution des  $CI_{50}$  pour *B. cinerea* au cyprodinile pour chacune des régions et pour  
 207      la fraise conventionnelle, la fraise à jours neutres et la vigne. L'axe des x représente les  $CI_{50}$  alors  
 208      que l'axe des y présente l'abondance associée à chacune de ces valeurs de  $CI_{50}$ . Théoriquement,  
 209      la résistance aux groupes 9 et 12 est associée à des mutations sur le facteur de transcription  
 210      *mrr1*, qui conduit à une surexpression du transporteur *atrB*. Dans ce cas, la cible n'est pas  
 211      modifiée, mais lorsque *atrB* est surexprimé, il y a une augmentation de l'activité des pompes  
 212      à efflux et donc un déplacement accru du fongicide vers l'extérieur de la cellule. Il a également  
 213      été proposé que les mutations sur le gène *Os-1* associées à la résistance au groupe 2  
 214      pourraient également conférer une certaine résistance aux groupes 9 et 12.



215 **Figure 16:** Distribution des Cl<sub>50</sub> pour *B. cinerea* au fludioxonile pour chacune des régions et pour  
216 la fraise conventionnelle, la fraise à jours neutres et la vigne. L'axe des x représente les Cl<sub>50</sub> alors  
217 que l'axe des y présente l'abondance associée à chacune de ces valeurs de Cl<sub>50</sub>.

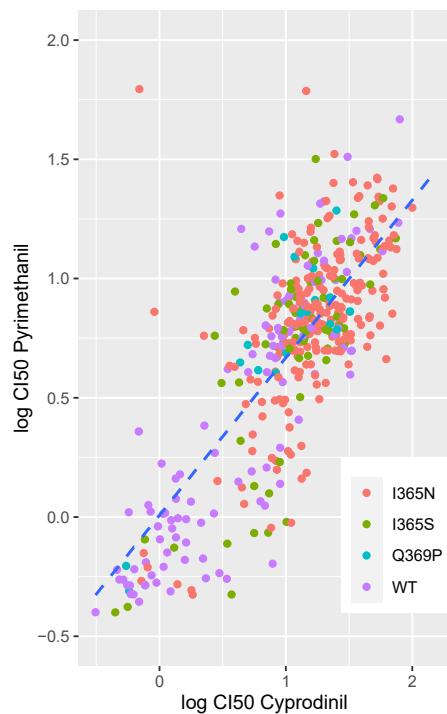
218 Les résultats de séquençage de la région *mrr1* ont permis d'identifier la présence d'un  
219 indel de 21 pb spécifique à *B. cinerea* groupe S, soit un nouveau clade génétiquement proche  
220 de *B. cinerea* (Lerch et al. 2013). Au total, 9.9% des isolats de la collection possédaient cet  
221 indel. Cependant, aucune mutation associée à la surexpression de *atrB* n'a été retrouvée  
222 jusqu'à présent. Par ailleurs, bien qu'en moyenne les Cl<sub>50</sub> observées pour le pyriméthanile et  
223 le cyprodinile soient plus élevées pour les isolats possédant une mutation du gène Os-1 par  
224 rapport aux phénotypes sauvages (Figure 17), la relation entre la Cl<sub>50</sub> des fongicides du groupe  
225 9 et les mutations Q369P-N373S, I365S ou I365N n'est pas significative. Il existe toutefois un  
226 patron de résistance croisé significatif entre le cyprodinile et le pyriméthanile (groupe 9) ( $R^2 =$   
227 0.88,  $P < 0.001$ ) (Figure 18), ce qui suggère un mécanisme de résistance commun.

228



229

230 **Figure 17:** Distribution des Cl<sub>50</sub> pour *B. cinerea* au A) pyriméthanile, B) cyprodinile et C)  
231 fludioxonile selon que les isolats possèdent ou non les principales mutations conférant une  
232 résistance à l'iprodione (groupe 2). Les valeurs de Cl<sub>50</sub> sont en ppm.



235 **Figure 18:** Patrons de résistance croisée observés entre le cyprodinile et le pyriméthanile. Les  
236 points de couleur indiquent le génotype des isolats pour le gène *Os-1* associé à la résistance au  
237 groupe 2 et potentiellement impliqué dans la résistance aux groupes 9 et 12.

### 239 1.6 les profils de résistance multiples

241 Le suivi de la résistance de *B. cinerea* aux fongicides dans la fraise à jours neutres, la fraise  
242 conventionnelle (fraise d'été) et la vigne a permis de dégager plus de 30 profils génétiques de  
243 résistance multiple (PGRM), soit des profils où on retrouve chez les isolats des combinaisons  
244 de mutations conférant de la résistance à plusieurs fongicides. Cependant, les cinq profils  
245 PGRM les plus importants représentent 71% des isolats échantillonnés. Le profil PGRM1  
246 (29.8%) était le plus abondant (résistant aux strobilurines, au fenhexamid, aux dicarboximides  
247 et aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase), le PGRM2 (résistant aux strobilurines aux  
248 dicarboximides et aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase) était présent chez 19,0%  
249 des isolats, alors que le PGRM3 résistant aux strobilurines, aux dicarboximides et au boscalid)  
250 et le PGRM4 (sensible à tous les groupes) étaient présents chez 8.8 et 6.8% des isolats,  
251 respectivement (Tableau 1).

253 La distribution des PGRM varie largement d'une région à l'autre. Par exemple, le PGRM1  
254 est présent chez 64.6%, 54.9% et 53.5% des isolats recueillis dans les régions de Chaudière-  
255 Appalaches, Laurentides et de la Capitale nationale, respectivement. En revanche, il est  
256 présent chez 39.1%, 24.5%, 10.1% et 2.16% des isolats recueillis en Mauricie, dans le Centre-  
257 du-Québec, en Montérégie et en Estrie, respectivement (Tableau 1). La distribution des PGRM  
258 varie également beaucoup d'une culture à l'autre. Dans la fraise à jours neutres, les PGRM1  
259 et 2 représentent plus de 84% des isolats recueillis tandis que le PGRM 4 (sensible) ne  
260 représente que 0.52% des isolats recueillis (Tableau 2). Dans la fraise conventionnelle, les  
261 PGRM1 et 2 représentent un peu moins de 60% des isolats recueillis tandis que le PGRM 4  
262 représente 8.3% des isolats recueillis (Tableau 2). Pour la vigne en revanche, ce sont les  
263 PGRM 3 et 5 qui sont les plus abondants, mais ces derniers ne représentent que 31.1% des  
2023

264 isolats, alors que le PGRM4 représentait 8.6% des isolats recueillis (Tableau 2). C'est d'ailleurs  
 265 pour la vigne que les patrons PGRM sont les plus diversifiés. Il sera intéressant d'établir les  
 266 liens avec les profils d'utilisation des fongicides.

267  
 268 **Tableau 4 :** Distribution des profils génétiques de résistance aux fongicides en pourcentage à  
 269 travers les différentes régions échantillonnées.  
 270

<i>Profils de résistance</i>	<i>Capitale-Nationale</i>	<i>Centre-du-Québec</i>	<i>Chaudière-Appalaches</i>	<i>Estrie</i>	<i>Laurentides</i>	<i>Mauricie</i>	<i>Montérégie</i>
<b>GPRM1</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>N230I</sub></sup> , Hydro <sup>R</sup> , Dic <sup>R</sup>	53.47	24.49	64.62	2.16	54.90	39.13	10.11
<b>GPRM2</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>N230I</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>R</sup>	24.26	32.65	23.08	9.91	18.63	18.84	20.22
<b>GPRM3</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>H272R</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>R</sup>	0.00	10.20	4.62	18.10	1.96	8.70	11.80
<b>GPRM4</b> QoI <sup>S</sup> , SDH <sup>I<sub>S</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>S</sup>	3.47	4.08	1.54	10.78	0.98	4.35	12.36
<b>GPRM5</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>H272R</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>S</sup>	0.99	2.04	1.54	19.40	0.98	4.35	3.37
<b>GPRM6</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>H272R</sub></sup> , Hydro <sup>R</sup> , Dic <sup>R</sup>	5.94	6.12	0.00	9.91	9.80	8.70	2.25
<b>GPRM7</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>P225F</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>R</sup>	0.99	0.00	1.54	4.31	2.94	5.80	13.48
<b>GPRM8</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>S</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>S</sup>	2.97	2.04	0.00	4.74	1.96	4.35	8.99
<b>GPRM9</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>P225F</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>S</sup>	0.00	0.00	1.54	8.19	1.96	0.00	1.69
<b>GPRM10</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>H272R</sub></sup> , Hydro <sup>R</sup> , Dic <sup>S</sup>	0.00	4.08	0.00	4.31	0.00	0.00	3.37

271

272  
 273 **Tableau 5 :** Distribution des profils génétiques de résistance aux fongicides en pourcentage par  
 274 culture échantillonnée.  
 275

<i>Profils de résistance</i>	<i>Conventionnelles</i>	<i>Jours neutres</i>	<i>Vignes</i>	<i>Moyenne</i>
<b>GPRM1</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>N230I</sub></sup> , Hydro <sup>R</sup> , Dic <sup>R</sup>	34.96	62.30	1.66	29.84
<b>GPRM2</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>N230I</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>R</sup>	24.36	21.99	12.91	19.15
<b>GPRM3</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>H272R</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>R</sup>	6.59	1.57	15.89	8.80
<b>GPRM4</b> QoI <sup>S</sup> , SDH <sup>I<sub>S</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>S</sup>	8.31	0.52	8.61	6.79
<b>GPRM5</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>H272R</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>S</sup>	2.87	0.52	15.23	6.57
<b>GPRM6</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>H272R</sub></sup> , Hydro <sup>R</sup> , Dic <sup>R</sup>	8.88	2.09	2.98	6.46
<b>GPRM7</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>P225F</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>R</sup>	1.43	3.66	10.60	4.90
<b>GPRM8</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>S</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>S</sup>	3.44	0.00	8.61	4.34
<b>GPRM9</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>P225F</sub></sup> , Hydro <sup>S</sup> , Dic <sup>S</sup>	0.29	0.52	7.28	2.78
<b>GPRM10</b> QoI <sup>R</sup> , SDH <sup>I<sub>H272R</sub></sup> , Hydro <sup>R</sup> , Dic <sup>S</sup>	0.86	0.52	4.64	2.00

276  
 277

278 **Résistance chez les agents phytopathogènes de la fraise**

279     **1. L'anthracnose de la fraise (*Colletotrichum acutatum*)**

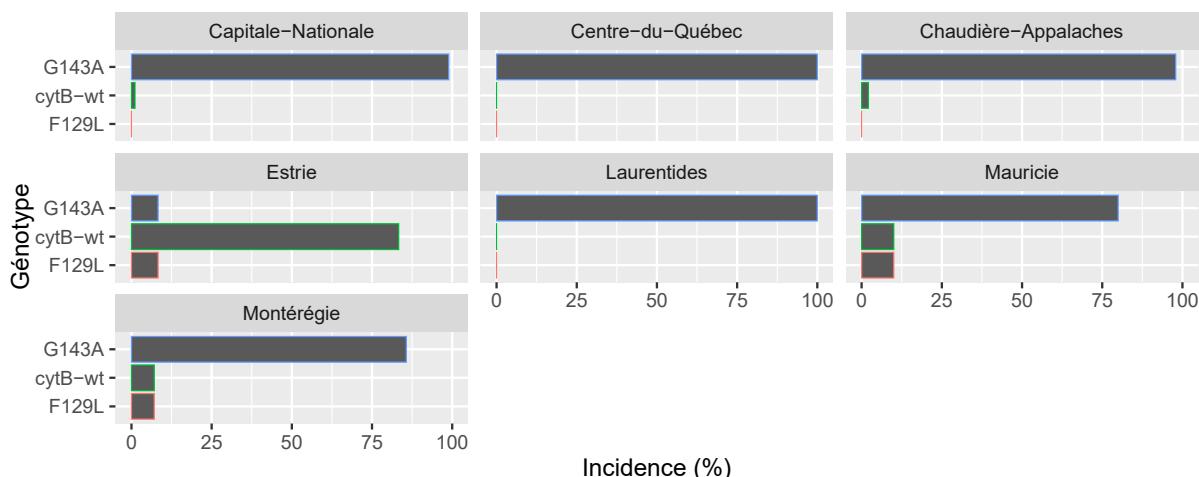
280     **1.1 les strobilurines**

281     Les strobilurines (groupe 11) sont composées des ingrédients actifs et produits suivants  
282     homologués dans la fraise : pyraclostrobine (CABRIO), fluoxastrobine (EVITO), trifloxystrobine  
283     (FLINT), mandestrobine (INTUITY), azoxystrobine (QUADRIS). Ces ingrédients actifs sont  
284     parfois mélangés à d'autres dans la composition des produits suivants : trifloxystrobine +  
285     groupe 7 (LUNA SENSATION), pyraclostrobine + groupe 7 (MERIVON, PRISTINE) et  
286     azoxystrobine + groupe 3 (QUADRIS TOP).

287

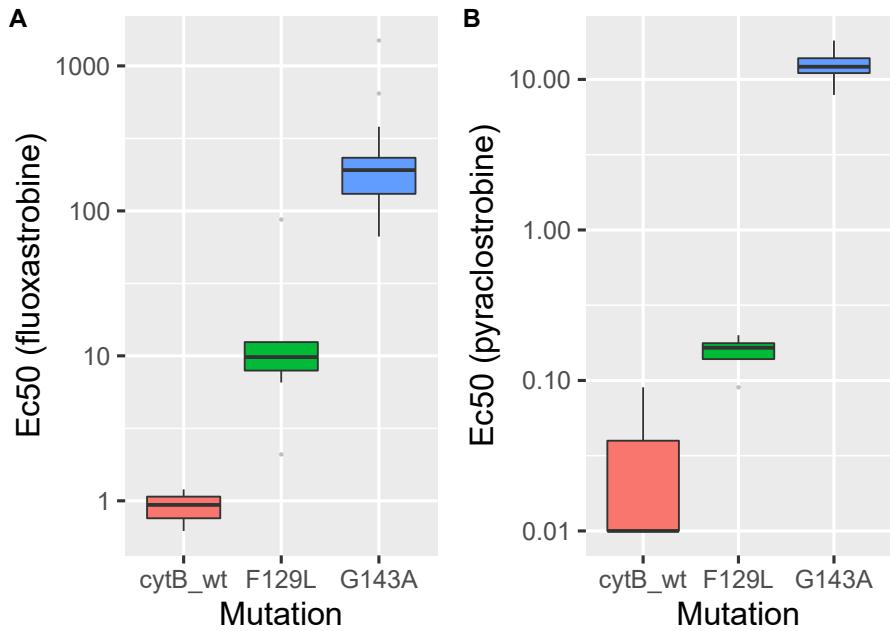
288     Pour *C. acutatum*, la résistance aux strobilurines est majoritairement associée à la mutation  
289     G143A, mais on retrouve aussi la mutation F129L, qui est également localisée sur le gène  
290     *Cytb*. Comme pour *B. cinerea*, la proportion d'isolats G143A est généralement très élevée.  
291     Elle varie de 8.3% à 100% (moyenne = 94.7%) (Figure 19). La proportion d'isolats F129L est  
292     moins élevée, elle varie de 0% à 10% (moyenne = 2.1%) (Figure 19). Comme pour *B. cinerea*,  
293     les isolats possédant la mutation G143A ont une  $CI_{50}$  ~100 fois plus élevée que les isolats du  
294     génotype sauvage (Figure 20). Les mutants F129L ont quant à eux une  $CI_{50}$  ~10 fois plus  
295     élevée que les isolats du génotype sauvage (Figure 20). En moyenne, les isolats du phénotype  
296     sauvage avaient une  $CI_{50}$  de 0.03 et 0.9 ppm, tandis que les isolats G143A avaient une  $CI_{50}$  de 12.5 et >100 ppm et les génotypes F129L avaient en moyenne une  $CI_{50}$  de 0.16 et 20.2  
297     ppm pour la pyraclostrobine et le fluoxastrobine, respectivement (Figure 20).  
298

299



300

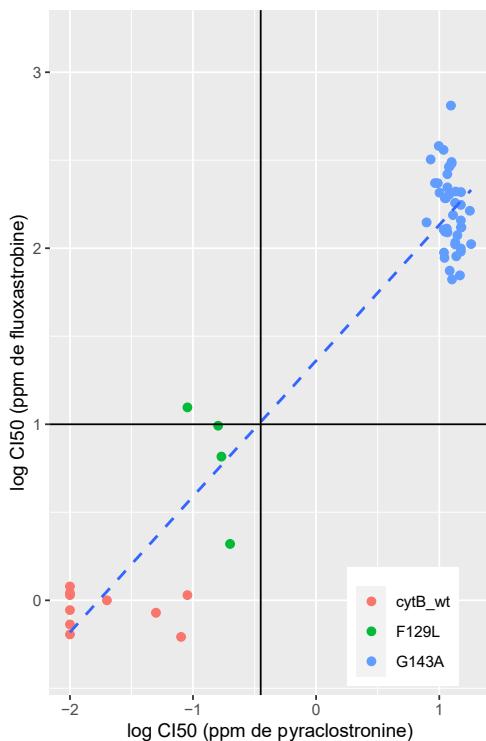
301     **Figure 19:** Distribution des génotypes de résistance de *C. acutatum* par région. Les génotypes  
302     G143A et F129L sont associés à une résistance multiple aux fongicides du groupe 11, alors que  
303     les génotypes G143\_wt sont sensibles aux fongicides du groupe.



304

305 **Figure 20 :** Sensibilité des isolats de *Colletotrichum acutatum* possédant ou non les principales  
 306 mutations conférant une résistance aux matières actives du groupe 11. Les valeurs de Cl<sub>50</sub> sont  
 307 en ppm.

308 Comme pour *B. cinerea*, on observe également des patrons de résistance croisée entre les  
 309 matières actives du groupe 11. Lorsque l'on compare les Cl<sub>50</sub> obtenues pour la pyraclostrobine  
 310 et la fluoxastrobine, on obtient une forte corrélation ( $R^2 = 0.91, P < 0.001$ ).



311

312 **Figure 21:** Patrons de résistance croisée observés entre la pyraclostrobine et fluoxastrobine. Les  
 313 points bleus représentent les isolats ne possédant pas la mutation G143A tandis que les points  
 314 rouges représentent les isolats possédant cette mutation.

315

## 316    1.2. Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase

317

318       Contrairement à *B. cinerea*, les fongicides du groupe 7 sont intrinsèquement inefficaces  
 319 contre les maladies causées par les espèces de *Colletotrichum*, incluant *C. acutatum* (Ishii et  
 320 al., 2016 ; Liang et al, 2020). Cette tolérance naturelle n'est pas basée sur des mutations dans  
 321 les gènes codant pour la succinate déshydrogénase (Ishii et al., 2016). C'est d'ailleurs ce que  
 322 nous observons pour les *C. acutatum* testés dans le cadre de ce projet. Pour le bosalide, le  
 323 fluxapyroxade et le fluopyrame on n'observe pas d'inhibition aux doses testées (0 – 100 ppm).  
 324 D'autre part, toutes les souches ont été séquencées pour la sous-unité b de la succinate  
 325 déshydrogénase, mais aucune mutation liée à la résistance aux fongicides n'a été retrouvée.  
 326

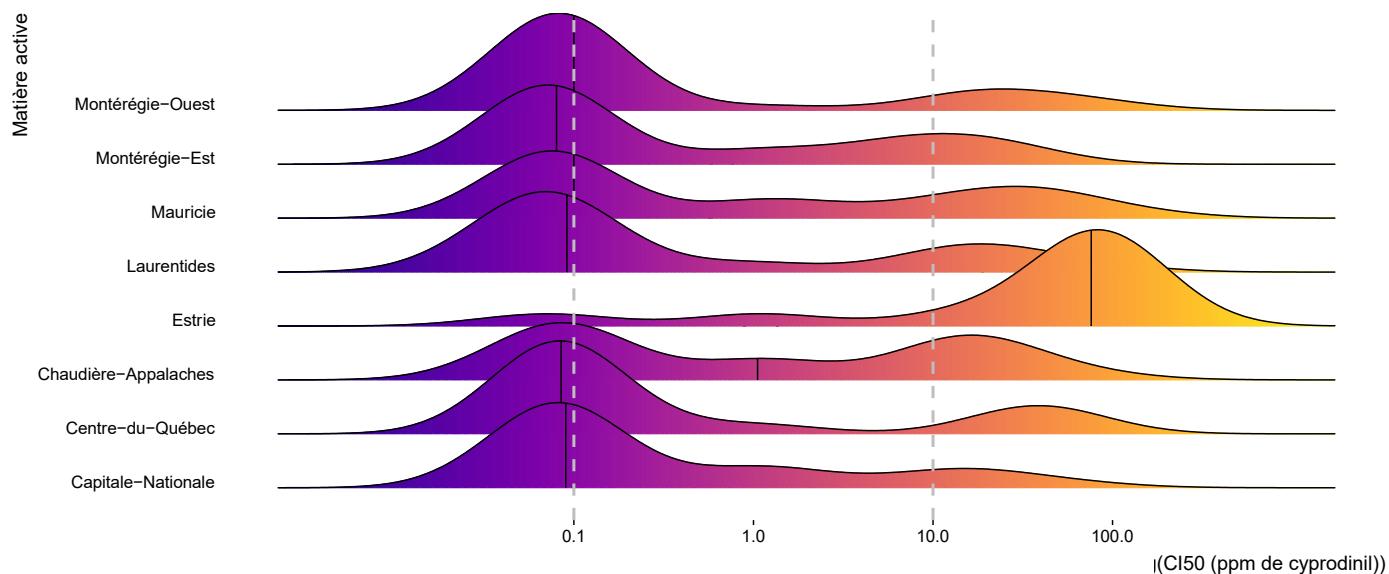
327       Cela étant dit, de récents rapports suggèrent que la matière active du groupe 7  
 328 benzovindiflupyre pourrait être efficace pour contrôler *C. acutatum*, mais elle n'est pas  
 329 homologuée dans la culture (Liang et al, 2020). Le pydiflumétofène, une nouvelle matière  
 330 active du groupe 7 récemment homologuée dans la culture pourrait également être testée afin  
 331 d'en vérifier l'efficacité. Cette matière active est toutefois très dispendieuse et n'a donc pas pu  
 332 être testée en bioessais pour *C. acutatum* dans le cadre du présent projet.  
 333

## 334    1.3 les anilinopyrimidines et les phénylpyrrolos

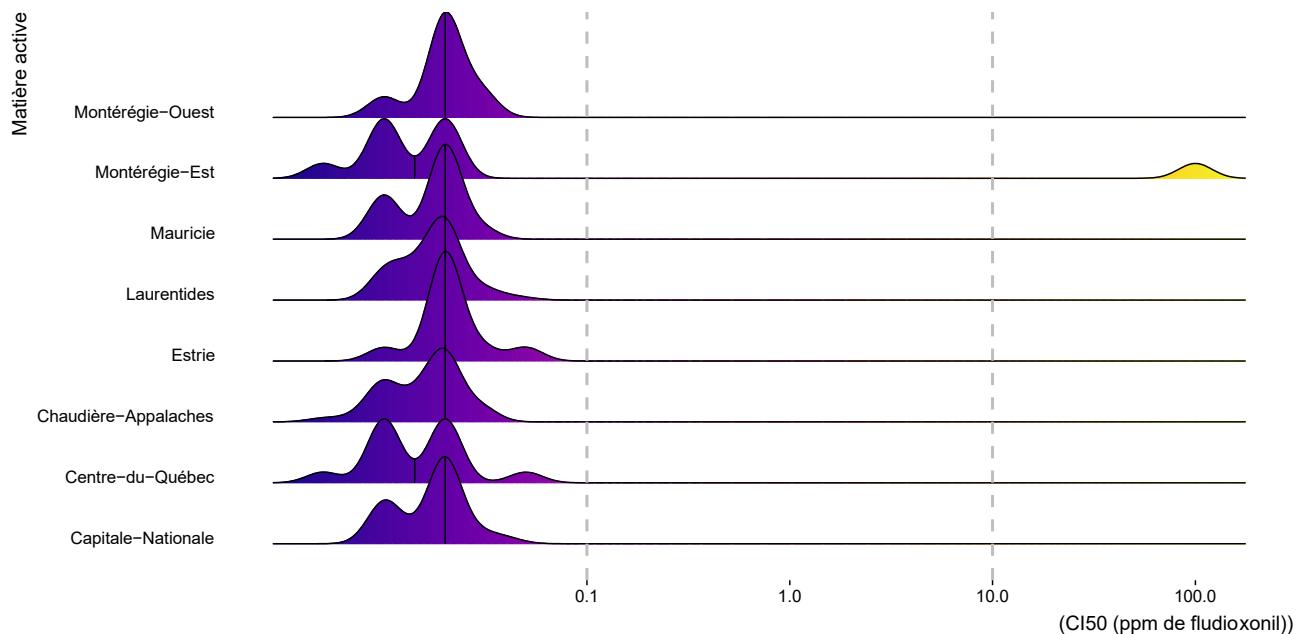
335       Les groupes 9 et 12 sont composés des ingrédients actifs et produits suivants homologués  
 336 pour la fraise : pyriméthanil (9) (SCALA, IMPALA) et fludioxonil (12) (SCHOLAR). Ces  
 337 ingrédients actifs entrent également dans la composition des produits en mélange suivants :  
 338 cyprodinil (9) + groupe 3 (INSPIRE SUPER), pyriméthanil (9) + groupe 7 (LUNA  
 339 TRANQUILITY), cyprodinil (9) + groupe 12 (fludioxonil).

340       Dans le cadre du présent inventaire, les niveaux de résistance au cyprodinile variaient de 21%  
 341 à 50%, avec une moyenne provinciale de 33.5%. Les CI<sub>50</sub> étaient en moyenne de 25.9 ppm  
 342 pour les isolats résistants et de 0.13 ppm pour les isolats sensibles (Figure 22). Pour le  
 343 fludioxonile, un seul isolat avait une CI<sub>50</sub> supérieure à 1 ppm et donc considérée comme  
 344 résistant (Figure 23). Les CI<sub>50</sub> étaient en moyenne de 0.02 ppm pour les isolats sensibles et le  
 345 seul isolat résistant avait une CI<sub>50</sub> >100ppm (Figure 23)

346



347      **Figure 22:** Distribution régionale des Cl<sub>50</sub> pour *C. acutatum* au cyprodinile. L'axe des x représente  
348      les Cl<sub>50</sub> alors que l'axe des y présente l'abondance associée à chacune de ces valeurs de Cl<sub>50</sub>.  
349



350      **Figure 23:** Distribution régionale des Cl<sub>50</sub> pour *C. acutatum* au fludioxonile. L'axe des x représente  
351      les Cl<sub>50</sub> alors que l'axe des y présente l'abondance associée à chacune de ces valeurs de Cl<sub>50</sub>.

352

## 353      2. Le blanc de la fraise (*Podosphaera aphanis*)

354      Il n'a malheureusement pas été possible d'obtenir de résultats de résistance aux fongicides  
355      pour le blanc de la fraise. Très peu d'information est disponible quant à sa génétique, son  
356      génome n'a été séquencé que très récemment (Heaven et al. 2023). Aucune séquence de  
357      référence n'est disponible pour les principaux gènes et régions géniques impliqués dans la  
358      résistance aux fongicides. Malgré le développement de plusieurs amorces de séquençage, il  
359      n'a pas été possible d'obtenir des séquences qui nous permettaient de détecter la mutation  
360      avec assurance. Une hypothèse qui pourrait expliquer cette difficulté à développer un outil  
361      moléculaire simple pour le séquençage de la région génique du cytochrome b est que *P.*  
362      *aphanis* soit hétéroplasmique comme c'est le cas de *Podosphaera xanthii* (Vielba-Fernandez  
363      et al. 2018), cette dernière hypothèse reste bien sûr à confirmer. L'hétéroplasmie désigne la  
364      coexistence de mitochondries normales et mutées au sein d'une même cellule. Si tel est le  
365      cas, un même isolat de *P. aphanis* pourrait posséder à la fois des copies mutantes et des  
366      copies normales du *cytb*. La présence de la mutation ne suffit pas à déterminer si la souche  
367      est résistante ou non, il faut connaître la proportion des allèles mutés. Un nombre croissant  
368      d'allèles possédant la mutation augmente les chances que la souche soit résistante. En effet,  
369      dans leur étude, Vielba-Fernandez et al. (2018) ont pu déterminer qu'afin d'avoir un phénotype  
370      résistant aux strobilurines, une souche de *P. xanthii* devait détenir au moins 70% d'allèles  
371      G143A alors que chez les souches sensibles, l'allèle muté pouvait aussi être présent et la  
372      proportion variait de 10 à 60%.

373

374

## 375      Résistance chez les agents phytopathogènes de la vigne

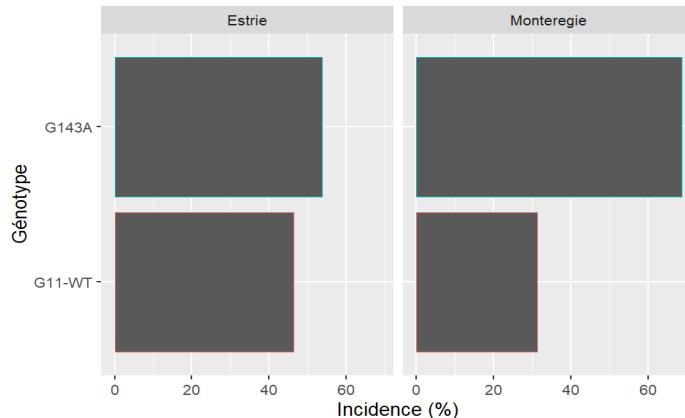
376

377        1. Le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*)

378

379        1.1 Les strobilurines

380        Pour *P. viticola*, la résistance aux strobilurines (groupe 11) est aussi associée à la mutation  
381 G143A localisée sur le cytochrome b. Pour ce gène, 227 des 320 isolats ont pu être  
382 caractérisés. La proportion des échantillons de la présente étude pour lesquels le génotype  
383 est résistant est modérée. Cette proportion varie de 54% en Estrie à 69% en Montérégie  
384 (Figure 25).



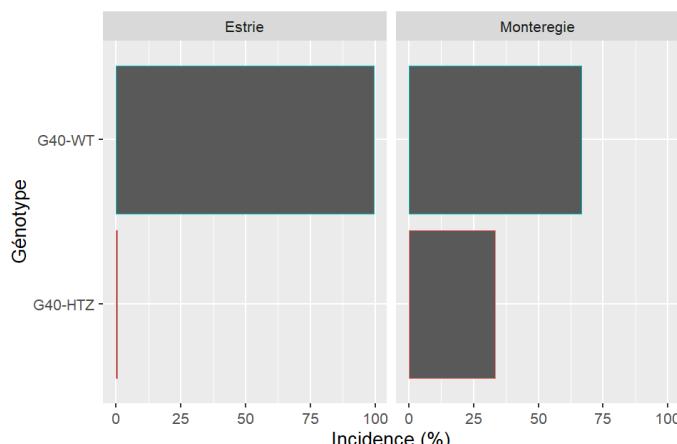
385

386        **Figure 25:** Distribution des génotypes de résistance de *P. viticola* par région. Le génotype G143A  
387 est associé à une résistance multiple aux fongicides du groupe 11, alors que le génotype G143-wt  
388 est sensible aux fongicides du groupe.

389

390        1.2 Les amides de l'acide carboxylique

391        La résistance aux amides de l'acide carboxylique (groupe 40) est pour sa part causée par  
392 la mutation G1105S localisée sur le gène cesA3. Pour ce gène, 271 des 320 isolats ont pu  
393 être caractérisés. Aucun échantillon de *P. viticola* du présent inventaire ne possédait de  
394 mutation à la position 1105 (Figure 26). Toutefois 10,7% de ceux-ci étaient hétérozygotes  
395 (HTZ), donc porteurs de la mutation sur un des deux allèles. En Estrie, les hétérozygotes ne  
396 représentaient que 0,5% des échantillons prélevés alors qu'en Montérégie il s'agissait plutôt  
397 de 33%. Bien que la mutation soit récessive, la présence d'hétérozygotes dans la population  
398 démontre un potentiel pour le développement de la résistance aux CAAs.



399

400 **Figure 26:** Distribution des génotypes de résistance de *P. viticola* par région. Le génotype G1105S  
401 (pas représenté sur le graphique puisqu'il n'a pas été détecté parmi les échantillons traités) est  
402 associé à une résistance multiple aux fongicides du groupe 40, alors que les génotypes G40-wt et  
403 G40-HTZ sont sensibles aux fongicides du groupe.

404

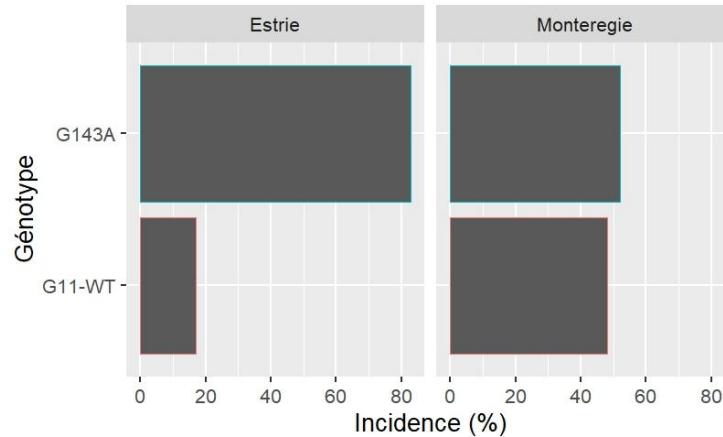
## 405 **2. Le blanc de la vigne (*Erysiphe necator*)**

406

### 407 **1.1 Les strobilurines**

408 Pour *E. necator*, la résistance aux strobilurines (G11) est aussi associée à la mutation  
409 G143A localisée sur le cytochrome b. Pour ce gène, 169 des 200 isolats ont pu être  
410 caractérisés. La proportion d'échantillons résistants est de 52% en Montérégie et de 83% en  
411 Estrie (Figure 27).

412



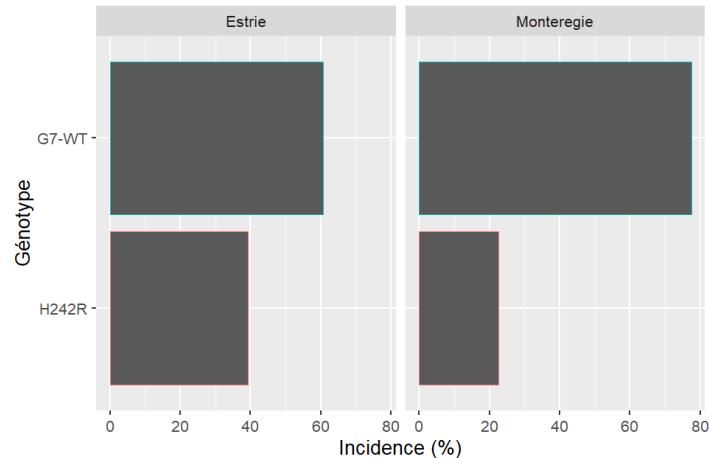
413

414 **Figure 27:** Distribution des génotypes de résistance de *E. necator* par région. Le génotype G143A  
415 est associé à une résistance multiple aux fongicides du groupe 11, alors que le génotype G11-wt  
416 est sensible aux fongicides du groupe.

417

### 418 **1.2. Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase**

419 Pour *E. necator*, la résistance aux SDHI (G7) est principalement associée à la mutation  
420 H242R localisée sur la sous-unité b du gène *sdh*. Pour ce gène, 156 des 200 isolats ont pu  
421 être caractérisés. La proportion des échantillons de la présente étude qui sont résistants varie  
422 de 23% en Montérégie à 39% en Estrie (Figure 28).



423

424 **Figure 28:** Distribution des génotypes de résistance de *E. necator* par région. Le génotype H242R  
 425 est associé à une résistance au boscalide, alors que le génotype G7-wt est sensible aux fongicides  
 426 du groupe.

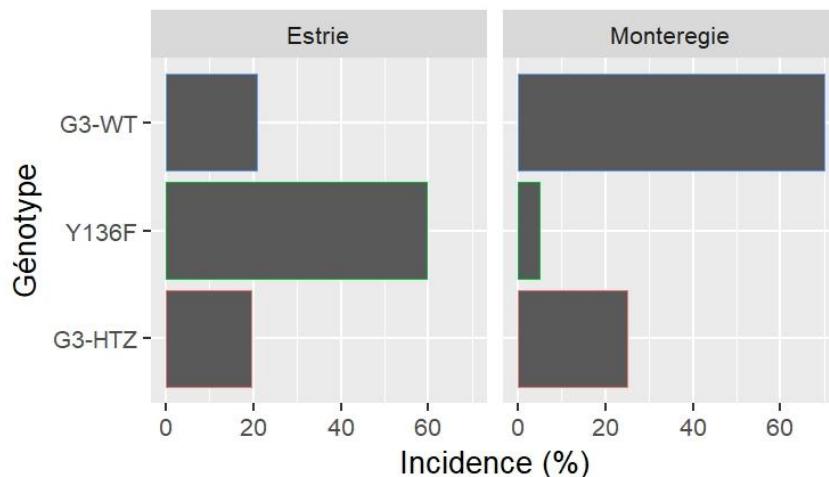
427

### 428 1.3. Les inhibiteurs de la déméthylation

429 Pour *E. necator*, la résistance au difénoconazole est principalement associée à la mutation  
 430 Y136F localisée sur le gène *cyp51*. Le succès d'amplification du fragment nécessaire pour la  
 431 détection de cette mutation n'était pas très élevé, sur un total de 200 isolats d'*E. necator*,  
 432 seulement 90 isolats ont pu être caractérisés. La proportion des échantillons de la présente  
 433 étude qui sont résistants est très variable entre les deux régions échantillonnées. En effet la  
 434 proportion d'isolats résistants (Y136F) en Estrie est de 60% alors que cette proportion n'est  
 435 que de 5% en Montérégie. La proportion d'isolats possédant les deux génotypes (G3-HTZ) est  
 436 toutefois moins variable entre les régions, elle est de 19% en Estrie et de 25% en Montérégie  
 437 respectivement. (Figure 29).

438 La mutation A1119C est aussi associée à une forte résistance aux fongicides des  
 439 inhibiteurs de la déméthylation (Frenkel et al. 2025). Les résultats de séquençage de celle-ci  
 440 ne sont pas présentés dans le cadre de ce rapport puisque le succès d'amplification du  
 441 fragment permettant sa détection était très faible et peu de résultats sont disponibles.

442



443

444      **Figure 29:** Distribution des génotypes de résistance d'*E. necator* par région. Le génotype Y136F  
445      est associé à une résistance aux fongicides du groupe 3, le génotype HTZ porte la mutation  
446      récessive sur un des deux allèles du gène, mais est sensible alors que le génotype G3-wt est  
447      sensible aux fongicides du groupe.

448

449      **Résistance chez les agents phytopathogènes de l'oignon**

450

451      **1. *Botrytis squamosa***

452      La pression exercée sur la culture d'oignon par *B. squamosa* était relativement faible et, bien  
453      que 370 échantillons aient été prélevés, la proportion d'échantillons isolés par rapport au  
454      nombre d'échantillons affectés était faible. Sur les 370 échantillons prélevés, seulement 215  
455      isolats de *B. squamosa* ont été obtenus (efficacité d'isolation de 58%).

456      Basée sur un facteur de résistance supérieur à 2, l'incidence de la résistance était de 83%  
457      pour le boscalide, avec des CI<sub>50</sub> variant de 0 à > 100 ppm (Tableau 6, Figure 30). Pour le  
458      fluopyram, 78% des isolats étaient résistants et les valeurs de CI<sub>50</sub> étaient comprises entre  
459      0,01 ppm et 1,59 ppm (moyenne = 0,43 ppm). Pour le fluxapyroxade, les valeurs de CI<sub>50</sub> étaient  
460      comprises entre 0,001 ppm et 4,35 ppm (moyenne = 0,67 ppm) et 79% des isolats étaient  
461      considérés résistants. Pour les fongicides du groupe 7, seule la mutation H272Y a été  
462      retrouvée sur le gène codant pour la succinate déshydrogénase.

463      Les valeurs de CI<sub>50</sub> étaient comprises entre 0,05 ppm et 10,88 ppm (moyenne = 1,19 ppm)  
464      pour la picoxystrobine et 76% des souches étaient considérées comme étant résistantes.  
465      L'incidence de la résistance pour la pyraclostrobine était de 61% et les valeurs de CI<sub>50</sub> étaient  
466      comprises entre 0,06 ppm et 0,83 ppm (moyenne = 0,39 ppm) (Tableau 7, Figure 30).  
467      Contrairement à *B. cinerea* ou à *C. acutatum*, il n'a pas été possible d'amplifier le cytochrome  
468      b, où les mutations associées à la résistance au groupe 11 se trouvent.

469      Le difénoconazole a également été testé dans le cadre de ce projet, l'incidence de la  
470      résistance était de 80%, les CI<sub>50</sub> étaient comprises entre 0,025 ppm et 0,39 ppm (moyenne =  
471      0,18 ppm). Pour le fludioxonol l'incidence de la résistance était de 5%, les valeurs de CI<sub>50</sub>  
472      étaient comprises entre 0,014 ppm et 0,038 ppm (moyenne = 0,026 ppm). Pour le pyriméthanil  
473      (groupe 9), les valeurs de CI<sub>50</sub> étaient comprises entre 0,15 ppm et 15,17 ppm (moyenne =  
474      0,98 ppm) et l'incidence de la résistance était de 39% (Tableau 8, Figure 30).

475

476      **Tableau 6.** Facteurs de résistance des souches testées pour leur sensibilité aux fongicides du  
477      groupe FRAC 7

FR	Boscalide	Fluopyram	Fluxapyroxad
	N= 82	N=88	N=87
<2	17%	22%	21%
>2 & < 10	1%	70%	16%
> 10	82%	8%	63%

478

479 **Tableau 7.** Facteurs de résistance des souches testées pour leur sensibilité aux fongicides du  
480 groupe FRAC 11

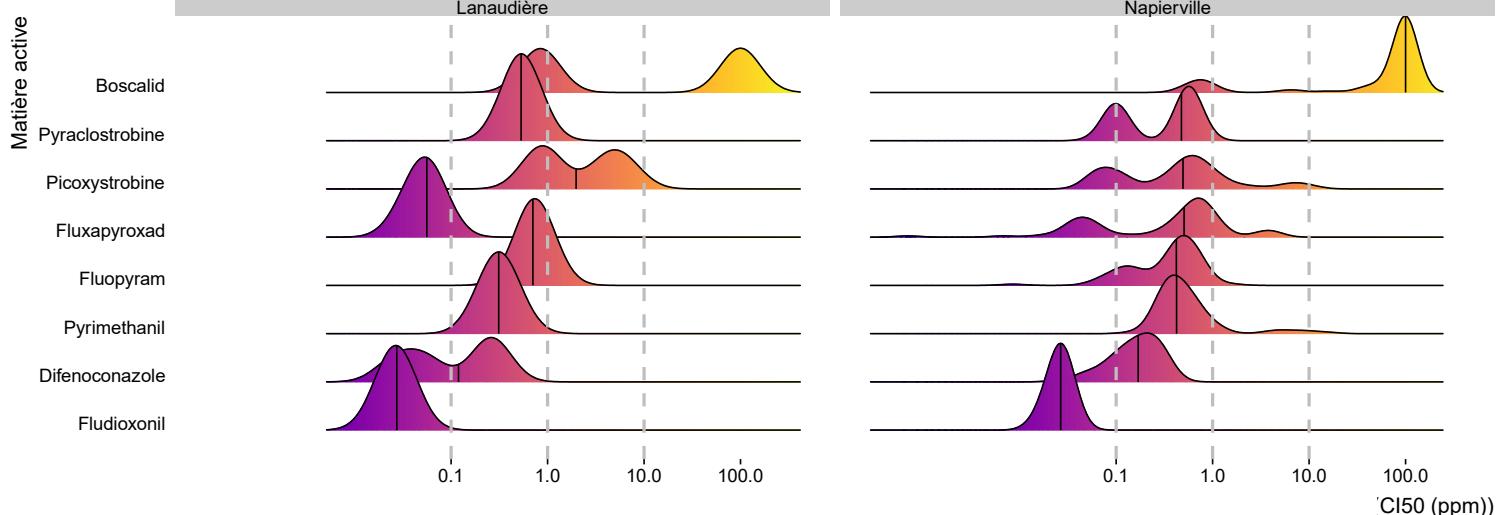
FR	Picoxystrobine	Pyraclostrobine
	N= 86	N=87
<2	24%	39%
>2 & < 10	30%	60%
> 10	46%	1%

481

482 **Tableau 8.** Facteurs de résistance des souches testées pour leur sensibilité aux fongicides des  
483 groupes FRAC 3, 9 et 12

FR	Difénoconazole	Pyriméthanile	Fludioxonil
	N= 87	N=87	N=87
<2	20%	61%	95%
>2 & < 10	80%	32%	5%
> 10	0%	7%	0%

485  
486



488 **Figure 30:** Distribution régionale des Cl<sub>50</sub> pour *B. squamosa* aux différents fongicides testés dans  
 489 le cadre de ce projet. L'axe des x représente les Cl<sub>50</sub> alors que l'axe des y présente l'abondance  
 490 associée à chacune de ces valeurs de Cl<sub>50</sub>.

491

492

### 493 Diffusion, formation et encadrement

494 Les résultats du projet ont fait l'objet d'une présentation en février 2020 à Drummondville  
 495 lors de la journée Inpacq horticole. En 2021, les résultats ont également été diffusés à travers  
 496 les avertissements du réseau d'avertissement phytosanitaire (RAP), dans les fiches  
 497 techniques sur l'antracnose et la moisissure grise publiées annuellement. Ils ont également  
 498 fait l'objet d'une chronique dans les Nouvelles fraîches, publiées par l'Association des  
 499 producteurs de fraises et framboises du Québec. Les résultats ont été présentés en avril 2021  
 500 aux conseillers participant au projet. En février 2022, une présentation a été faite aux  
 501 conseillers de Sollio, pour les sensibiliser aux risques de développement de résistance. En  
 502 mars 2023, une présentation a été faite lors des rencontres de recherche des RAP petits fruits  
 503 et RAP vigne. De plus, en juillet 2023, une présentation a été faite lors de la journée de  
 504 conférence et de partage à la Ferme expérimentale d'Agriculture et Agroalimentaire Canada  
 505 de Freightsburg dans le cadre de l'événement " La gestion intégrée des ennemis des cultures "  
 506 pour les vigneronnes et vigneron du Québec. Un article scientifique est en cours de  
 507 préparation et nous espérons que les résultats seront publiés d'ici la fin de 2024.

508 Un autre aspect important du projet touche la formation d'étudiants gradués et au  
 509 Baccalauréat. Une étudiante à la Maîtrise (Marie Poulin-Ouellette), co-supervisée par Dr Odile  
 510 Carisse, H. Van der Heyden et K. Bouarab, a travaillé sur la résistance de *B. squamosa* aux  
 511 fongicides (Annexe 2). De plus, plusieurs stagiaires coop ont été formés au laboratoire soit :  
 512 Antoine Castonguay (Baccalauréat UdeS), Coralie Godon (Baccalauréat UdeS), Daphnée  
 513 Sabourin (Baccalauréat UQAM), Émilie Roy (Baccalauréat UdeM), Michel Renaud  
 514 (Baccalauréat UdeS), Naomi Aubut (Baccalauréat UdeS) et Sarika Beauchemin (Baccalauréat  
 515 UdeM).

516

517

518

519 **BIBLIOGRAPHIE**

- 520 **Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri, A., Peres, N. A., and Schnabel,**  
521 **G.** 2014. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven  
522 southern U.S. states. *Plant Dis.* 98:825-833.
- 523 **Frenkel, O., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., and Milgroom, M. G.** 2015. Mechanisms of  
524 resistance to an azole fungicide in the grapevine powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*.  
525 *Phytopathology* 105:370-377.
- 526 **Stammler, G. et Speakman, J.** 2006. Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis*  
527 *cinerea* to boscalid. *Journal of Phytopathology* 154, 508-510.
- 528 **Vielba-Fernández, A., Bellón-Gómez, D., Torés JA, de Vicente A., Pérez-García, A.,**  
529 **Fernández-Ortuño, D.** 2018. Heteroplasmy for the Cytochrome b Gene in *Podosphaera*  
530 *xanthii* and its Role in Resistance to Qo1 Fungicides in Spain. *Plant Dis.* Aug;102(8):1599-  
531 1605. doi: 10.1094/PDIS-12-17-1987-RE. Epub 2018 Jul 3. PMID: 30673427.
- 532

533 **POINT DE CONTACT POUR INFORMATION**

- 534 **Anne Piuze-Paquet, M.sc**  
535 Téléphone : 450-454-3992  
536 Courriel : [apiuze@phytodata.ca](mailto:apiuze@phytodata.ca)  
537 Cie de Recherche Phytodata  
538 291 rue de la coopérative  
539 Sherrington, Québec, J0L 2N0  
540

## ANNEXES

### ANNEXE I : Protocoles de PCR-Séquençage

**Tableau 1. Tableau récapitulatif des amores utilisées pour les gènes de résistance ciblés**

Espèce	Nom amorce	Séquence (5'-3')	Concentration (mM)	Gène cible	Longueur du fragment (pb)	Programme PCR
<i>Botrytis cinerea</i>	Qoi13extF	GGTATAACCGACGGGTTATAGAATAG	300	Cytb	560/2000	A
	Qoi14extR	AACCATCTCCATCCACCATACCTACAAA	300			
	SdhF	AAGGTATCTGCAGGAGTTGT	300		567	A
	SdhR	ATCTCCGCAATTGCCAACCC	300			
	Erg27F	TGTTTCGGAGATCATGCC	300	Erg27	244	B
	F412Send	ACCAGGAACCTCGGTTCGTA	300			
	BcOS05	GAGGCTTCCAAAAAGCTCTAC	200	Os-1	1030	C
	BcOS10R	TCTTGGTCAAATCCTCTGGCGACA	200			
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Cgramctyb-bf1	GAAGAGGTATGACTACGGTTCATATAG	300	Cytb	500	A
	Cgramctyb-br1	TAGCAGCTGGAGTTGCATAG	300			
	KES719_F	CTBCCNCACACCTACGTCGTCAAGGAC	300	Sdhb	414	A
	KES729_R	CTTCTTRATCTCVGCRATVGCC	300			
<i>Erysiphe necator</i>	ENCBF4	GTATGAACAATAGGTGTTGAA	400	Cytb	456	D
	ENCBR3	CATTGGGTTAGCCATAATAT	400			
	SdhB-3F	AGACGAAGCTGTAGAGAGGGT	300	Sdhb	700	E
	SdhB-3R	GCTGGAGAAAAACGCCCTTCAA	300			
	CYP51F-Y136	TCATCTCTTCCCAGCCTATC	200	Cyp51	1700	F
	CYP51R-Y136	GTATTGAGGCAGGGTAAATCG	200			
	ENcyp1055F-A1119	TTCTGATGGCTGGACAACAC	300	Cyp51	697	G
	ENcyp1752R-A1119	AACCCATAACACCTGCCATAAA	300			
<i>Plasmopara viticola</i>	CB279F	TATACATATTTTAGGGGTTG	200	Cytb	538	H
	StrobIR	CCACTCAGGAACAATATGTAAGG	200			
	PVcesa3F	GCACAGCAGACATGGTTTCCTT	250	CesA3	612	I
	PVcesa3R	GTCCAAAAGTGCAAA GTCCAACG	250			

Les mélanges réactionnels ont été préparés en utilisant le Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer à concentration finale 1x et en ajoutant du BSA à une concentration finale de 0,2 mg/ml.

À noter que le mélange réactionnel de *E. necator* pour l'amplification du cyp51-Y136F contient aussi du DMSO à une concentration finale de 3 % et que le mélange réactionnel pour l'amplification du cyp51-A1119C contient du MgCl<sub>2</sub> à une concentration finale de 0,5 mM. De plus, le mélange réactionnel de *P. viticola* pour l'amplification du cyt b contient de la bétaine à une concentration finale de 1 M, du MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM et du DMSO 3 %.

**Tableau 2. Tableau des programmes PCR utilisés**

Programme	Étape	Température	Durée
A	Dénaturation initiale	98°C	2 min
	40 cycles	Dénaturation	98°C 10s
		Hybridation	60°C 15s
		Élongation	72°C 30s
B	Élongation finale	72°C	10 min
	Dénaturation initiale	98°C	2 min
	35 cycles	Dénaturation	98°C 10s
		Hybridation	60°C 15s
C		Élongation	72°C 30s
	Élongation finale	72°C	10 min
	Dénaturation initiale	98°C	2 min
	35 cycles	Dénaturation	98°C 10s
D	Hybridation	62°C	15s
		Élongation	72°C 1 min
	Élongation finale	72°C	10 min
	Dénaturation initiale	98°C	2 min
E	40 cycles	Dénaturation	98°C 10s
		Hybridation	56°C 30s
		Élongation	72°C 30s
	Élongation finale	72°C	10 min
F	Dénaturation initiale	98°C	2 min
	35 cycles	Dénaturation	98°C 10s
		Hybridation	64°C 30s
		Élongation	72°C 30s
G	Élongation finale	72°C	10 min
	Dénaturation initiale	98°C	2 min
	40 cycles	Dénaturation	98°C 10s
		Hybridation	61°C 30s
H		Élongation	72°C 30s
	Élongation finale	72°C	10 min
	Dénaturation initiale	98°C	2 min
	35 cycles	Dénaturation	98°C 10s
I	Hybridation	46°C	15s
		Élongation	72°C 30s
	Élongation finale	72°C	10 min
	Dénaturation initiale	98°C	2 min
I	35 cycles	Dénaturation	98°C 10s
		Hybridation	65°C 30s
		Élongation	72°C 30s
	Élongation finale	72°C	10 min

**Tableau 3. Amorces utilisées pour le séquençage SANGER et séquences de référence GenBank utilisées pour la détection des mutations associées à la résistance à l'aide du logiciel Geneious**

Espèce	Amorce de séquençage	No accession GenBank de la séquence de référence	Gène cible	Codon	Mutation	Nucléotides de la mutation	Séquence de nucléotides supplémentaires
<i>Botrytis cinerea</i>	Qoi13extF	AB262969	Cytb	143	G143-WT	GGT	TGAGGTTTT
		AB428335			Bcbi-143/144 intron	GGT	
		AB262969			G143A	GCT	
	sdhF	HQ622630	Sdhb	272	H272-WT	CAC	TGTCAACT
					H272L	CTC	
					H272R	CGC	
					H272V	GTC	
					H272Y	TAC	
				225	P225-WT	CCC	TGCTTCCTCC
					P225F	TTC	
					P225H	CAC	
				230	N230-WT	AAC	TGGAACAGT
					N230I	ATC	
	F412Send	AY220532	Erg27	412	F412-WT	TTC	ATCTGCTAC
					F412C	TGC	
					F412I	ATC	
					F412S	TCC	
					F412V	GTC	
	BcOS05	AF396827	Os-1	365	I365-WT	ATC	GAAATCGAA
					I365N	AAC	
					I365S	AGC	
				373	N373-WT	AAC	TGGAACACA
					N373S	AGC	
				369	Q369-WT	CAG	GTCCAGGGC
					Q369H	CAC ou CAT	
					Q369P	CCG	
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Cgramctyb-bf1	AY285743	Cytb	143	G143-WT	GGT	TGAGGTGCA
					G143A	GCT	
				129	F129-WT	TTC	GGTTTCCTG
					F129L	TTG	
	KES719F	XM_007596512.1	Sdhb	272	H272-WT	CAC	TGCCACACG
					H272L	CTC	
					H272R	CGC	
					H272V	GTC	
					H272Y	TAC	
				225	P225-WT	CCG	TGCCCCGTCT
					P225F	TTC	
					P225H	CAC	

				230	N230-WT N230I	AAC ATC	TGGAACTC
<i>Erysiphe necator</i>	ENCBF4	KY418048.1	Cytb	143	G143-WT G143A	GGT GCT	TGAGGTGCT
	SdhB-3R	JNVN01000276.1	Sdhb	242	H242-WT H242R	CAT CGT	
	CYP51R-Y136	EF649776.1 EF649777.1	Cyp51	136	Y136-WT Y136F	TAT TTT	GTATATGAT
	ENcyp1752R-A1119	KM077178.1	Cyp51	373	A1119-WT A1119C	GCA GCC	
<i>Plasmopara viticola</i>	CB279F	DQ459459.1	Cytb	143	G143-WT G143A	GGT GCT	TGGGGTGCA
	PVcesA3F	GQ258975.1	CesA3	1105	G1105-WT G1105-HTZ G1105S	GGC RGC AGC	
							TTCGGCTCG

Tableau 4. Interprétation des résultats de séquençage basé sur la relation obtenu en la mutation et la valeur de CI50 des bioessais

Espèce	Gène	Codon	Mutation	Interprétation de la résistance	
<i>Botrytis cinerea</i>	Cytb	143	G143-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11	
			Bcbi-143/144 intron	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11	
			G143A	Résistant aux fongicides du groupe FRAC 11	
	Sdhb	272	H272-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 7	
			H272L	n.d. car pas suffisamment de données	
			H272R	Résistant au bosalide	
			H272V	n.d. car pas suffisamment de données	
			H272Y	Résistant au bosalide	
		225	P225-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 7	
			P225F	Fortement résistant aux fongicides du groupe FRAC 7	
			P225H	n.d. car pas suffisamment de données	
		230	N230-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 7	
			N230I	Moyennement résistant aux fongicides du groupe FRAC 7	
	Erg27	412	F412-WT	Sensible au fenhexamide (groupe FRAC 17)	
			F412C	Résistant au fenhexamide (groupe FRAC 17)	
			F412I	Résistant au fenhexamide (groupe FRAC 17)	
			F412S	Résistant au fenhexamide (groupe FRAC 17)	
			F412V	Résistant au fenhexamide (groupe FRAC 17)	
	Os-1	365	I365-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 2	
			I365N	Résistant aux fongicides du groupe FRAC 2	
			I365S	Résistant aux fongicides du groupe FRAC 2	
		373	N373-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 2	
			N373S	Résistant aux fongicides du groupe FRAC 2	
		369	Q369-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 2	
			Q369H	n.d. car pas suffisamment de données	

			Q369P	Résistant aux fongicides du groupe FRAC 2
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Cytb	143	G143-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11
			G143A	Très résistant aux fongicides du groupe FRAC 11
		129	F129-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11
			F129L	Résistant aux fongicides du groupe FRAC 11
	Sdhb	272	H272-WT	<i>C. acutatum</i> est connu comme étant naturellement insensible aux fongicides du groupe FRAC 7. Aucune mutation n'a été détecté sur le gène sdhb dans le cadre du projet 19-2.2-06-PHYTO.
			H272L	
			H272R	
			H272V	
			H272Y	
		225	P225-WT	
			P225F	
			P225H	
		230	N230-WT	
			N230I	
<i>Erysiphe necator</i> *	Cytb	143	G143-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11
			G143A	Résistant aux fongicides du groupe FRAC 11
	Sdhb	242	H242-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 7
			H242R	Résistant au bosalide (résistance inconnue aux autres fongicides du groupe 7)
	Cyp51	136	Y136-WT	Sensible aux fongicides du groupe 3
			Y136F	Résistant aux fongicides du groupe 3
	Cyp51	373		Sensible aux fongicides du groupe 3
				Résistant aux fongicides du groupe 3
<i>Plasmopara viticola</i> *	Cytb	143	G143-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 11
			G143A	Résistant aux fongicides du groupe FRAC 11
	CesA3	1105	G1105-WT	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 40
			G1105-HTZ	Sensible aux fongicides du groupe FRAC 40 mais portant un allèle résistant (hétérozygote récessif)
			G1105S	Résistant aux fongicides du groupe FRAC 40

\* Les données de génotypage n'ont pas été validées à l'aide de bioessais, il n'est donc pas possible de connaître le facteur de résistance associé à la mutation ni s'il existe des différences de sensibilité pour les différents fongicides d'un même groupe.

1

2 ANNEXE II : Revue de littérature

3

4

5 Piuze-Paquet, A. et Van der Heyden, H. 2023. Portrait provincial des profils de résistance aux fongicides dans les cultures de la fraise, de la  
6 vigne et de l'oignon. © Compagnie de recherche Phytodata Inc. 90 p.

7    ANNEXE III : Mémoire de maîtrise  
8  
9    Poulin-Ouellette, M. (2023). RÉSISTANCE AUX FONGICIDES, AGRESSIVITÉS ET AGENTS CAUSAUX : IMPLICATIONS POUR LA  
10   GESTION DE LA MALADIE DE LA BRÛLURE DE LA FEUILLE DE L'OIGNON [Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke].  
11

12